

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LIA FORDIANI LENATI PATRICIO

**ISOLAMENTO, CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DE CÃES**

CURITIBA

2010

LIA FORDIANI LENATI PATRICIO

**ISOLAMENTO, CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS CANINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosangela Locatelli Dittrich

Co-orientadora: Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto

CURITIBA

2010



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"ISOLAMENTO, CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CÃES"** apresentada pela Mestranda **Lia Fordiani Lenati Patricio**, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE /UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2010

Professora Dr^a Rosangela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professor Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Membro

Professor Dr. Peterson Triches Dornbush
Membro

Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebellato
Co-orientadora

AGRADECIMENTOS

Ao Luis Claudio, por estar sempre disposto a ajudar, fazer correções e aconselhar, por não perder a paciência nos momentos de mau humor; por não reclamar nos momentos em que eu estive ausente, por me acompanhar ao laboratório nos sábados, domingos e feriados. Por me acompanhar sempre.

Aos meus pais e à minha irmã, por me mostrarem que a distância não afasta as pessoas e por estarem sempre presentes, me acompanhando em minhas empreitadas.

À professora Rosangela pela orientação, pelos ensinamentos, por toda a ajuda e confiança em mim depositada, e principalmente pelos sete anos de paciência! Professora, você me ajudou a crescer e a me tornar uma profissional.

À Carmen, por toda a ajuda, ensinamentos, disposição, paciência e boa vontade. Muito obrigada pela acolhida tão calorosa e por ser sempre tão prestativa.

À equipe do Laboratório Experimental de Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, especialmente ao Dr. Paulo Brofman, por todo o apoio, ensinamentos e disponibilização do laboratório para realização do projeto.

Aos funcionários, estagiários, monitores, residentes e bolsistas do laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hospital Veterinário da UFPR pela ajuda nas intermináveis limpezas e desinfecções do Laboratório de Cultivo Celular. Em especial à Nina e à Kemy, por toda a ajuda, no trabalho e fora dele, pelos momentos de distração e diversão, pelos quebra-galhos e pela amizade.

Aos residentes da clínica cirúrgica de pequenos animais do HV-UFPR pelo auxílio e coletas das amostras.

"Cada fracasso ensina ao homem algo que ele precisava aprender."

Charles Dickens

RESUMO

As células tronco são células não diferenciadas de embriões, fetos ou tecidos adultos, com o potencial de gerar células de diversos tecidos sob o estímulo bioquímico, hormonal e mecânico adequado, *in vitro* ou *in vivo*. As células tronco embrionárias e fetais são pluripotentes e as células tronco adultas são multipotentes e não especializadas. Dentre as células tronco adultas, as células tronco mesenquimais (CTMs) já foram identificadas em diferentes órgãos e tecidos, como tecido adiposo e medula óssea. O tecido adiposo é uma fonte promissora das CTMs por sua disponibilidade e fácil coleta. As CTMs têm sido utilizadas na terapia celular regenerativa, área em desenvolvimento muito pesquisada atualmente, que tem como objetivo a regeneração de tecidos lesionados, perdidos ou com perda de função. O presente estudo contém uma revisão bibliográfica sobre as CTMs, com destaque para o isolamento dessas células a partir do tecido adiposo e da medula óssea, seu cultivo, diferenciação, caracterização e aplicações, e dois capítulos com experimentos. No primeiro capítulo está descrito o isolamento, cultivo, estudo cinético e diferenciação das CTMs do tecido adiposo subcutâneo de cinco cães. Foram obtidas, em média, 146.803 células/g de tecido adiposo, e durante o período de cultivo, a cada passagem, foram obtidas em média $1,87 \times 10^6$ células/mL, com 99,2% de células viáveis a cada passagem, em média. Das cinco amostras coletadas e induzidas à diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos, três se diferenciaram nos três tipos de tecido e a diferenciação foi avaliada pela citoquímica. No capítulo II estão descritos o estudo morfológico e morfométrico das CTMs isoladas de tecido adiposo subcutâneo de cães. Foram realizadas a descrição morfológicas das células em cultivo, mensuração do comprimento da célula, da largura da célula e do diâmetro do núcleo e o estudo clonogênico, para avaliação do número de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFC-F). O comprimento médio das células foi de 87,73 μm , a largura média foi de 21,21 μm e a média do diâmetro do núcleo foi de 16,35 μm . O número médio de colônias formadas foi de 30,59 UFC-F/placa. Com base nesses resultados concluímos que o tecido adiposo subcutâneo de cães é uma fonte viável das CTMs, as quais foram caracterizadas pela diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. A caracterização morfológica das CTMs auxilia na identificação dessas células na fase de cultivo celular.

PALAVRAS-CHAVE: Células tronco mesenquimais, tecido adiposo, cães.

ABSTRACT

The stem cells are non-differentiated embryo, fetal or adult tissue cells that have the capacity to self-renew and to differentiate into more mature cells when properly stimulated *in vitro* or *vivo*, by biochemical, hormonal or mechanical treatment. Differently than embryonic or fetal stem cells, which are known to be pluripotent, the adult stem cells are multipotent and non-specialized. Among the adult stem cells, those known as mesenchymal stem cells (MSC) have been identified in organs and tissues, such as bone marrow and adipose tissues. Adipose tissues are promising sources of MSC due to their disponibility and ease of harvest. MSC have been used for cell therapy in regenerative medicine, a growing research field today, in which regeneration of injured and non-functional tissues is studied. This study reviews the MSC research available today, with focus on the development of these cells from adipose tissue and bone marrow, their culture, differentiation, characterization and application. Further, this study includes two chapters in which the results of researches conducted by the author are presented. The first chapter describes the isolation, culture, kinetic study and differentiation of MSC from the adipose tissue of five dogs. The cell culture was started with approximately 146,803 cells/g from adipose tissue, which were cultured at each cell transfer to an average of 1.87×10^6 cells/mL, with 99.2% of viability. Three out of the five initial samples were differentiated into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes, the differentiation was assessed in this study. The second chapter describes morphological and morphometric studies of the MSC isolated from the subcutaneous adipose tissue of dogs. This work includes the morphological description of the cultured cells, including the measurement of their length, width and nucleus diameter, as well as a clonogenic evaluation enumerating the number of fibroblasts colony forming units (CFU-F). The average measurements of cells length, width and nucleus diameter, were 87.73 μm , 21.21 μm and 16.35 μm respectively. The average number of UFC-F was 30.59/plate. From these results, it can be concluded that the subcutaneous adipose tissue of dogs is a viable source of MSC, their identification is made possible due to the cytochemical examination of their differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. The morphological characterization of MSC is important for the identification of the cells during culture.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cells, adipose tissue, dogs.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REAÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA.	54
FIGURA 2. CURVA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (AMOSTRA III) DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃO, NA TERCEIRA PASSAGEM.	56
FIGURA 3: DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE CÃO. APÓS 21 DIAS DE INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA FOI POSSÍVEL OBSERVAR A PRESENÇA DE VACÚOLOS LIPÍDICOS CORADOS COM O CORANTE “OIL RED O”, COM O USO DO MEIO DE DIFERENCIAÇÃO PARA ADIPÓCITOS Nº1 (A) E Nº2 (B). NÃO FOI OBSERVADA DIFERENCIAÇÃO ESPONTÂNEA NAS AMOSTRAS TRATADAS COM O MEIO CONTROLE (C).	58
FIGURA 4. DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE CÃO. APÓS 21 DIAS DE INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA FOI POSSÍVEL OBSERVAR A PRESENÇA DE DEPÓSITOS DE MATRIZ EXTRACELULAR CORADOS COM O CORANTE “ALIZARINA RED S”, COM O USO DO MEIO DE DIFERENCIAÇÃO PARA OSTEOBLASTOS (A E B). AS AMOSTRAS TRATADAS COM O MEIO CONTROLE NÃO APRESENTARAM DEPÓSITOS DE MATRIZ EXTRACELULAR (C).	58
FIGURA 5. DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE CÃO. APÓS 21 DIAS DE INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA FOI POSSÍVEL OBSERVAR A PRESENÇA DOS MUCOPOLISSACARÍDEOS DA MATRIZ INTRACELULAR CORADOS COM O CORANTE AZUL DE TOLUIDINA, COM O USO DO MEIO DE DIFERENCIAÇÃO PARA CONDRÓCITOS Nº1 (A) E COM O USO DO MEIO DE DIFERENCIAÇÃO PARA CONDRÓCITOS Nº2 (B). AS AMOSTRAS TRATADAS COM O MEIO CONTROLE NÃO APRESENTARAM MUCOPOLISSACARÍDEOS DA MATRIZ INTRACELULAR (C).	59
FIGURA 6. VALORES DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA NO PERÍODO DE INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO EM OSTEOBLASTOS, DAS CINCO AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO COLETADAS DE CÃO. AMOSTRAS CONTROLE E DIFERENCIAÇÃO.	60
FIGURA 7. ESTUDO MORFOLÓGICO: CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES (CORANTE DE WRIGHT, X400), APÓS CULTIVO DE 24H (A), 48H (B), 72H (C) E 96(D).	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MEIOS DE CULTIVO E CONCENTRAÇÕES DE SFB UTILIZADOS PARA CULTIVO DAS CTMS.....	24
TABELA 2 – MEIOS DE DIFERENCIAÇÃO UTILIZADOS PARA CULTIVO DAS CTMS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO E MEDULA ÓSSEA, NOS DIFERENTES ANIMAIS E HUMANO	27
TABELA 3. AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO COLETADAS DE CÃES.	46
TABELA 4. NÚMERO DE CÉLULAS ISOLADAS POR AMOSTRA DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES. NÚMERO TOTAL E NÚMERO DE CÉLULAS ISOLADAS POR GRAMA DE TECIDO ADIPOSEO.	55
TABELA 5. NÚMERO DE CÉLULAS OBTIDO POR PASSAGEM E VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE CULTIVO, ISOLADAS DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES.	56
TABELA 6. NÚMERO MÉDIO DIÁRIO DE CÉLULAS OBTIDAS NO ESTUDO DA CINÉTICA DO CRESCIMENTO CELULAR (AMOSTRA III) DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃO, REALIZADO COM A AMOSTRA NA TERCEIRA PASSAGEM.	57
TABELA 7. VALORES DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (UI/L) NO PERÍODO DE INDUÇÃO À DIFERENCIAÇÃO EM OSTEÓBLASTOS, DAS CINCO AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃO. AMOSTRAS CONTROLE E DIFERENCIAÇÃO.	61
TABELA 8. AMOSTRAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO COLETADAS DE CÃES.	76
TABELA 9. NÚMERO DE CÉLULAS ISOLADAS POR AMOSTRA DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES. NÚMERO TOTAL E NÚMERO DE CÉLULAS ISOLADAS POR GRAMA DE TECIDO ADIPOSEO.	84
TABELA 10. NÚMERO DE CÉLULAS OBTIDO POR PASSAGEM DAS CÉLULAS DE CULTIVO, ISOLADAS DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES.	84
TABELA 11. ENSAIO CLONOGÊNICO – NÚMERO MÉDIO DE UFC-F POR PASSAGEM, DE CADA AMOSTRA DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃO.	85
TABELA 12. NÚMERO MÉDIO DE UFC-F POR PASSAGEM REALIZADA, PARA CADA AMOSTRA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃO. COMPARAÇÃO ENTRE AS PASSAGENS.	85

TABELA 13. VALORES MÉDIOS \pm DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS MENSURADOS NO ESTUDO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS ISOLADAS DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES, DAS CINCO AMOSTRAS.....86

TABELA 14. VALORES MÉDIOS \pm DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS MENSURADOS NO ESTUDO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS ISOLADAS DO TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES, NAS TRÊS PASSAGENS.....86

TABELA 15. PARÂMETROS MENSURADOS NO ESTUDO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO SUBCUTÂNEO DE CÃES. COMPARAÇÃO ENTRE OS PERÍODOS DE CULTIVO.87

LISTA DE SIGLAS

Asc 2P – L-ácido ascorbico 2-fosfato
 α -MEM – meio essencial mínimo, modificação alfa
CD11b – grupamento de diferenciação 11b
CD13 – grupamento de diferenciação 13
CD14 – grupamento de diferenciação 14
CD19 – grupamento de diferenciação 19
CD29 – grupamento de diferenciação 29
CD34 – grupamento de diferenciação 34
CD44 – grupamento de diferenciação 44
CD45 – grupamento de diferenciação 45
CD73 – grupamento de diferenciação 73
CD79 α – grupamento de diferenciação 79 α
CD90 – grupamento de diferenciação 90
CD105 – grupamento de diferenciação 105
CEUA-SCA UFPR – Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná
CTM – célula tronco mesenquimal
DECH – doença do enxerto contra hospedeiro
DGKC – Associação de Química Clínica da Alemanha
D-Medium – Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado
DMEM – Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbeco
DMEM/F12 - Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbeco/ Mistura de Nutriente de Ham F-12
DMEM-LG - Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbeco com baixa glicose
FA – fosfatase alcalina
hMSC – célula tronco mesenquimal humana
IBMX – Isobutilmetilxantina
IMDM – Modificação de Iscove do meio de Eagle
ITS – insulina, transferrina e selenito de sódio
K-NAC – MCDB-53 modificado, suplementado com N-acetil-L-cisteína
MEM – meio essencial mínimo
MSCGM – meio de crescimento para células tronco mesenquimais
NAC – N-acetil-L-cisteína
PBS – solução de tampão fosfato
RPMI-1640 – meio desenvolvido no Instituto Memorial Parque Roswell
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB – Soro Fetal Bovino
TGFB1 – Fator de transformação de crescimento β 1
UFC-F – Unidades Formadoras de Colônias Fibroblásticas
UFPR – Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	18
3.2. CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO.....	23
3.3. DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO.....	25
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS	28
3.5. APLICAÇÃO E TERAPIA CELULAR.....	29
4. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO I - ISOLAMENTO, CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE CÃES.....	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. REVISÃO DE LITERATURA	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. ISOLAMENTO	46
3.2. CULTIVO.....	47
3.3. DIFERENCIAÇÃO	50
4. RESULTADOS	55
4.1. ISOLAMENTO DAS CTMS DE CÃO.....	55
4.2. CULTIVO.....	55
4.3. DIFERENCIAÇÃO	57
5. DISCUSSÃO	61

6. CONCLUSÕES	66
7. REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMETRIA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSO DE CÃES	71
RESUMO	71
ABSTRACT	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. REVISÃO DE LITERATURA	74
3. MATERIAL E MÉTODOS	75
3.1. ISOLAMENTO	75
3.2. CULTIVO	76
3.3. DIFERENCIAÇÃO	79
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
4. RESULTADOS	83
4.1. ISOLAMENTO DAS CTMS DE CÃO	83
4.2. CULTIVO	84
4.3. ENSAIO CLONOGÊNICO	84
4.4. ESTUDO DA MORFOLOGIA	85
4.5. DIFERENCIAÇÃO	88
5. DISCUSSÃO	88
6. CONCLUSÕES	90
7. REFERÊNCIAS	91
ANEXO 1	95

1. INTRODUÇÃO GERAL

As células tronco podem ser definidas como células não diferenciadas de embriões, fetos ou tecidos adultos, que têm como particularidade o potencial de gerar células de diversos tecidos sob o estímulo bioquímico, hormonal e mecânico adequado, *in vitro* ou *in vivo* (CSAKI *et al.*, 2007). Essas células indiferenciadas têm a capacidade de diferenciar-se em células específicas dos diferentes tecidos e de preservar sua própria população, gerando células filhas idênticas (ZAGO, 2005).

Diferentes das células tronco embrionárias e fetais, que são pluripotentes, as células tronco adultas são multipotentes, não especializadas e já foram identificadas em diferentes órgãos e tecidos, como sangue periférico, tecido adiposo, sistema nervoso central, músculo, epitélio intestinal, pele, dente e medula óssea (CSAKI *et al.*, 2007). As primeiras células tronco adultas identificadas foram as precursoras hematopoéticas, responsáveis pela produção das células sanguíneas na medula óssea (ZAGO, 2005).

Atualmente, as células mais estudadas são as células tronco mesenquimais (CTMs) por serem células multipotentes, com alta capacidade de se renovar e diferenciar em células de diversas linhagens de tecido conjuntivo (BITTENCOURT *et al.*, 2006) como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (KADIYALA *et al.*, 1997^a), além de poderem ser obtidas de diferentes tecidos como medula óssea e tecido adiposo (REBELATTO *et al.*, 2008).

As CTMs, uma vez isoladas, independente do tecido de origem, podem ser utilizadas principalmente em terapias celulares. A forma mais antiga de terapia celular é a transfusão de componentes sanguíneos, um dos procedimentos terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo todo. Porém, o principal foco atual de interesse da terapia celular é a medicina regenerativa, em que se busca a substituição de células ou tecidos lesado, senescentes ou perdidos para restaurar sua função. As formas de terapia celular que despertam as maiores esperanças da comunidade científica e da sociedade em geral são as terapias com células tronco (ZAGO, 2005).

Dentre as terapias celulares, a engenharia tecidual é uma área promissora para o tratamento regenerativo de diversas doenças. O uso das CTMs apresenta grande potencial, com aplicações, por exemplo, na correção de defeitos ósseos (NEUPANE *et al.*, 2008).

Toda CTM não-diferenciada exibe morfologia fibroblástica e padrão característico de marcadores de superfície (MARTIN *et al.*, 2002). Esses critérios, juntamente com a habilidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, têm sido usados para definição de um protótipo de fenótipo para CTMs que seja consistente entre as diferentes espécies (MARTIN *et al.*, 2002), incluindo rato (WOODBURY *et al.*, 2000), camundongo (PHINNEY *et al.*, 1999), cão (KADIYALA *et al.*, 1997^b) e humano (PITTENGER *et al.*, 1999).

O padrão ouro para a identificação das CTMs foi estabelecido por PITTENGER *et al.* (1999) como “fibroblastos capazes de se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica”. Essa definição funcional permite a afirmação da natureza de uma população das CTMs na ausência de marcadores específicos.

Essa identificação das células é importante para padronização de um protocolo de isolamento das CTMs de cão, seja da medula óssea ou do tecido adiposo, já que a terapia com células tronco, em geral, não utiliza as células diferenciadas e sim as células mononucleares, logo após o isolamento, para que a diferenciação ocorra *in vivo* e regenere o tecido lesionado. Uma vez definido esse protocolo, novos passos podem ser dados em direção às terapias e tratamentos que utilizem essas CTMs isoladas na medicina veterinária.

Em animais, estudos foram realizados com isolamento das CTMs de gatos (MARTIN *et al.*, 2002), cavalos (CARVALHO *et al.*; 2009; COLLEONI *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2007) ratos (KADIYALA *et al.*, 1997^a; LENNON & CAPLAN, 2006) e camundongos (BITTENCOURT *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2008; TROPEL *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Em cães, os trabalhos com CTMs são escassos. O isolamento dessas células a partir da medula óssea de cães foi realizado por pesquisadores nos Estados Unidos, Irã e Alemanha (CSAKI *et al.*, 2007; ESLAMINEJAD *et al.* 2007; KADIYALA *et al.*, 1997^b;) e por uma pesquisadora no Brasil (ZAMPROGNO, 2006). As CTMs do tecido adiposo foram isoladas por dois grupos na China (CUI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007), e isoladas e caracterizadas somente por pesquisadores nos Estados Unidos (NEUPANE *et al.*, 2008). Não existem até o momento relatos de estudos de cinética e morfologia das CTMs de cão.

O protocolo de obtenção das CTMs do tecido adiposo de cão, embora adaptado de protocolos estabelecidos para isolamentos de células de humanos,

precisa de novas adaptações para ser realizado no Brasil, principalmente devido à disponibilidade, custo dos materiais e reagentes e manutenção das células.

Este trabalho está dividido em duas partes. A primeira parte constitui-se de uma revisão de literatura sobre a célula tronco, com aspectos de definição, isolamento das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo, situação atual no Brasil e no mundo, principais usos e aplicações. A segunda parte está formada por dois artigos científicos apresentados em forma de capítulos, que foram escritos baseados nos resultados obtidos com o experimento. O primeiro capítulo é intitulado “Isolamento, cultivo e diferenciação de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de cães”, e o segundo “Caracterização morfológica e morfometria de células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo de cães”.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar células tronco mesenquimais do tecido adiposo subcutâneo de cães.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Coletar amostras de tecido adiposo subcutâneo de cães;

2.2.2. isolar e obter células tronco mesenquimais das amostras obtidas do tecido adiposo;

2.2.3. cultivar *in vitro* as células tronco mesenquimais originárias do tecido adiposo;

2.2.4. caracterizar as células isoladas sob os aspectos bioquímicos, citológicos e morfológicos;

2.2.5. induzir a diferenciação das células isoladas à osteoblastos, adipócitos e condrócitos;

2.2.6. Identificar as células diferenciadas nas linhagens osteogênicas, adipogênicas e condrogênicas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ISOLAMENTO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

As células tronco podem ser de origem embrionária, obtidas a partir da massa celular de embriões em fase inicial de desenvolvimento, ou originária de tecidos adultos. Essas últimas são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, substituindo células perdidas pelo desgaste natural ou necessárias para a regeneração de órgãos e tecidos após lesões variadas (ZAGO, 2005). Em 1998, pesquisadores nos Estados Unidos isolaram pela primeira vez células tronco embrionárias de humanos (SHAMBLOTT *et al.*, 1998; THOMSON *et al.*, 1998).

Diferentes das células tronco embrionárias e fetais, que são pluripotentes, as células tronco adultas são multipotentes, não especializadas (CSAKI *et al.*, 2007). As células tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes que têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em células de diversas linhagens de tecido conjuntivo (BITTENCOURT *et al.*, 2006) como osteoblastos, condrócitos, mioblastos e adipócitos (KADIYALA *et al.*, 1997^b).

A natureza estromal das CTMs pode ser caracterizada pela rápida aderência dessas células após o plaqueamento da medula óssea em baixa densidade celular. Essas células aderentes, chamadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (UFC-F), se proliferam e estabelecem colônias (ZAMPROGNO, 2007).

Essas células possuem propriedades como a clonogenicidade, que é a habilidade de perceber a baixa densidade celular ativando assim a capacidade de duplicação celular, multipotencialidade e capacidade de autorrenovação, que é o resultado de divisão celular assimétrica, ou seja, uma célula dará origem a uma célula tronco idêntica à ela e uma célula filha que se expandirá ou se diferenciará. Porém, essa propriedade de autorrenovação ainda não foi demonstrada *in vivo* (ZAMPROGNO, 2007).

Atualmente estudos realizados comprovaram a possibilidade de se isolar as CTMs de diferentes tecidos adultos como medula óssea (BITTENCOURT *et al.*, 2006; COLLEONI, *et al.*, 2009; CSAKI *et al.*, 2007; DVORAKOVA *et al.*, 2008; KADIYALA *et al.*, 1997^a; KADIYALA *et al.*, 1997^b; LENNON & CAPLAN, 2006; MARTIN *et al.*, 2002; SILVEIRA, *et al.*, 2009; SUNG *et al.*, 2008; SUTER *et al.*, 2004;

TROPEL *et al.*, 2004; WAGNER *et al.*, 2005; YAMAMOTO *et al.*, 2007), tecido adiposo (LEE *et al.*, 2004; ZUK *et al.*, 2002), folículo capilar e couro cabeludo (Shih *et al.*, 2005), ligamento periodontal (TRUBIANI *et al.*, 2005), timo e baço (KRAMPERA *et al.*, 2006) e de tecidos pré-natais, como placenta (IN'T ANKER *et al.*, 2004), sangue do cordão umbilical (ERICES *et al.*, 2000; REBELATTO *et al.*, 2008), medula óssea fetal, sangue, pulmão, fígado e baço (IN'T ANKER *et al.*, 2003). Essas células também podem ser isoladas do sangue periférico (ROUFOSSE *et al.*, 2004), semelhante ao que acontece com as células precursoras hematopoiéticas.

Atualmente, as principais pesquisas com CTMs humanas utilizam tecido adiposo pela facilidade de obtenção do material para pesquisa (BUNNELL *et al.*, 2008). Os trabalhos com animais como ratos e camundongos são realizados principalmente com objetivo de utilizar um modelo animal para pesquisas com humanos. As pesquisas atuais em Medicina Veterinária têm utilizado o cão, cavalo e gato, mas ainda existem poucos trabalhos publicados, principalmente no Brasil, onde se têm pesquisado CTMs do tecido adiposo de cavalos e CTMs da medula óssea de cães no Rio de Janeiro.

A seguir serão detalhadas as técnicas de isolamento das CTMs a partir do tecido adiposo e da medula óssea, em humanos, em outros animais e no cão. Na sequência serão abordados os tópicos de cultivo, diferenciação, caracterização e aplicação das CTMs.

3.1.1. TECIDO ADIPOSEO

A descoberta de uma subpopulação das CTMs em reservas de tecido adiposo de humanos adultos (ZUK *et al.*, 2002) trouxe esperanças e possibilidades de avanços para os estudos com células tronco adultas (ZUK *et al.*, 2001). O conceito de tecido adiposo como uma fonte pós-natal de células para terapias regenerativas tem despertado muito interesse. Por ser abundante e acessível, a gordura subcutânea pode ser obtida por procedimentos minimamente invasivos (VALÉE *et al.*, 2009). Além disso, a fração vascular do estroma do tecido adiposo possui até 2% de células com potencial para diferenciação em diferentes linhagens celulares como osteoblastos, condrócitos, adipócitos e células neurais, comparado com 0,002% para CTMs da medula óssea (STREM & HEDRICK, 2005). Portanto, as

CTMs do tecido adiposo possuem grande potencial para regeneração de órgãos, em particular para a produção de uma grande variedade de substitutos autólogos desenvolvidos pelas técnicas da engenharia tecidual (VALÉE *et al.*, 2009).

O primeiro método para isolamento das CTMs do tecido adiposo foi elaborado na década de 60 com amostras coletadas do epidídimo de ratos (RODBELL *et al.*, 1966). O método consiste na fragmentação do tecido adiposo com auxílio de bisturis, lavagens sucessivas com PBS para retirada dos eritrócitos, digestão do tecido com colagenase, e centrifugação para separação dos adipócitos das células tronco. Esse protocolo sofreu adaptações para diferentes espécies, incluindo humana e canina.

Em humanos as pesquisas com isolamento das CTMs do tecido adiposo são mais comumente feitas com amostras obtidas de cirurgias de lipoaspiração. A amostra obtida é digerida com uma solução de Colagenase tipo I, em agitação constante, a 37°C por 30 minutos. A solução é centrifugada para lavagem das células, que são colocadas em garrafas de cultivo celular, na concentração de 10^5 células/cm² (WAGNER *et al.*, 2005). Em uma variação de protocolo, a digestão é feita em placa de petri com uma solução de PBS e Colagenase tipo I a 0,075%. A amostra passa por repetidas centrifugações no processo de lavagem das células, que são colocadas nas garrafas de cultivo celular na concentração de 500 mg de tecido adiposo/cm² (BUNNELL *et al.*, 2008).

SUNG *et al.* (2008) descreveram o isolamento das CTMs do tecido adiposo de camundongos. Semelhante ao protocolo utilizado no isolamento das células de humanos, esse protocolo tem como variação o uso da Colagenase tipo IA e o uso de um tampão hemolítico para retirada de eritrócitos. YAMAMOTO *et al.* (2007) fizeram o isolamento das CTMs do tecido adiposo obtidas dos linfonodos de camundongos, utilizando protocolo semelhante aos descritos.

Em equinos o isolamento das CTMs do tecido adiposo é realizado a partir de tecido obtido da base da cauda, da fáscia do músculo glúteo superficial. A amostra é digerida em solução de PBS com 1% de albumina sérica bovina e 0,1% de Colagenase tipo I. A solução é centrifugada, as células são lavadas e então ressuspensas em Meio Essencial Mínimo (MEM) e colocadas em frascos de cultivo (VIDAL *et al.*, 2007).

Em cães pouco foi estudado sobre as CTMs do tecido adiposo. Os resultados preliminares de um estudo realizado no Brasil (SILVEIRA *et al.*, 2009),

cujo objetivo foi a padronização do protocolo para obtenção das CTMs da medula óssea e do tecido adiposo de cães, demonstraram a possibilidade de se isolar essas células de animais adultos e evidenciou o cão como um bom modelo para estudos pré-clínicos de humanos, uma vez que é possível isolar essas CTMs de maneira segura.

ZHANG *et al* (2007) realizaram um estudo na China com CTMs do tecido adiposo de um cão com o objetivo de estabelecer uma metodologia para isolamento e cultivo *in vitro* das CTMs do tecido adiposo do cão. As células foram diferenciadas em adipócitos, osteoblastos e células neurais.

CUI *et al* (2007), em um estudo também realizado na China, isolaram CTMs do tecido adiposo de cães com o objetivo de utilizar as células cultivadas e diferenciadas em osteoblastos em próteses de coral para o tratamento de grandes defeitos ósseos. O isolamento das células foi feito por digestão com Colagenase tipo I a 0,075% por 30 minutos.

Existe apenas um relato de trabalho nos Estados Unidos com CTMs do tecido adiposo de cão (NEUPANE *et al.*, 2008). Segundo os autores, o isolamento é feito com mais sucesso quando é coletado tecido adiposo subcutâneo, quando comparado com isolamentos menos bem sucedidos realizados a partir de tecido adiposo do omento e de depósitos de gordura inguinal. Nesse trabalho o isolamento foi realizado por digestão com Colagenase tipo 1A (1 mg/mL) com meio essencial mínimo (MEM) de cultivo contendo 0,2 mM de L-ácido ascorbico 2-fosfato (Asc 2P), 2 mM de N-acetil-L-cisteína (NAC), penicilina, estreptomicina e anfotericina, denominado “D-medium”, por 12 horas a 37°C. O plaqueamento foi feito com aproximadamente 8 g de tecido /frasco de 25 cm².

3.1.2. MEDULA ÓSSEA

As CTMs da medula óssea foram isoladas e identificadas pela primeira vez em um estudo realizado com ratos (FRIEDENSTEIN & PETRAKOVA, 1966) e foram inicialmente descritas como células não hematopoiéticas com potencial de diferenciação em tecidos de origem mesodermal, como adipócitos, osteoblastos, condrócitos e células da musculatura esquelética. Em estudos mais recentes foi possível observar o potencial das CTMs de se diferenciarem em tecidos da

ectoderme, como neurônios e da endoderme, como hepatócitos (KRAMPERA, 2006).

As diversas vantagens das CTMs originárias da medula óssea, demonstradas nas pesquisas iniciais, justificaram o uso de animais como modelo para estudos pré-clínicos. Com esse objetivo, as CTMs da medula óssea foram isoladas com sucesso de ratos (SCHWARZ *et al.*, 1999), gatos (MARTIN *et al.*, 2002), cães (KADIYALA *et al.*, 1997^b), babuínos (DEVINE *et al.*, 2001), coelho (WAKITANI *et al.*, 1994; AWAD *et al.*, 1999), porco (RINGE *et al.*, 2002), cabra (MOSCA *et al.*, 2000) e ovelha (JESSOP *et al.*, 1994).

Originalmente o isolamento foi realizado com uso de Percoll (Sigma®), o qual separa as células por diferenças de gradiente de densidade e que permite a separação em fases, separando eritrócitos, polimorfonucleares, plaquetas e plasma das células mononucleares. Para o mesmo propósito, WAGNER *et al.* (2005) utilizaram Biocoll (Biochrom®), com sucesso, para isolamento da medula óssea de humanos e DVORAKOVA *et al.* (2008) utilizaram Ficoll-paque (GE Healthcare Bio-Sciences®). SUNG *et al.* (2008) realizaram isolamento das CTMs da medula óssea de camundongos com Histopaque (Sigma®).

Em uma variação do protocolo original, a medula óssea coletada de camundongo é centrifugada e as células resultantes são lavadas com meio de cultivo e então semeadas em frasco de cultivo (TROPEL *et al.*, 2004; LENNON & CAPLAN, 2006). Nesse caso, as células não aderentes são removidas após três dias, removendo-se dessa forma as células sanguíneas e excluindo-se o uso de um separador por gradiente de densidade.

Em gatos o isolamento das CTMs foi realizado com uso de Percoll (Sigma®) para separação da camada de células mononucleares, que são semeadas em frascos de cultivo na concentração de 2×10^5 células/cm² (MARTIN *et al.*, 2002).

Em cães existem poucos relatos de isolamento das CTMs da medula óssea, mas os relatos existentes incluem técnicas de isolamento com uso de separador de gradiente de densidade (CSAKI *et al.*, 2007 / Ficoll-paque, GE Healthcare Bio-Sciences®) e sem (SUTER *et al.*, 2004). De acordo com SUTER *et al.* (2004) a viabilidade das células isoladas por essa última técnica é superior a 85%.

3.2. CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO

O cultivo celular é um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo, mantendo as características próprias (FRESHNEY, 1994). Na terapia regenerativa e engenharia tecidual o cultivo celular é realizado com o objetivo de expansão do número de células isoladas. Essa expansão é realizada pela manutenção das células em frascos de cultivo, com meio de cultivo apropriado, suplementado com diversos fatores, de acordo com o destino final das células, até que as células atinjam 80-85% de confluência. Atingida essa confluência, as células são tripsinizadas e expandidas para mais frascos ou frascos maiores, técnica denominada de passagem celular.

As CTMs podem ser cultivadas em meio de cultivo completo, em frascos ou placas de cultura, nos quais elas se aderem, começam a se proliferar e formam as UFC-F (KRAMPERA *et al.*, 2006). Essas células se tornam uma população aderente cada vez mais homogênea e de acordo com estudos de caracterização com CTMs humanas, tem potencial para se proliferarem sem se diferenciarem por até 40 gerações ou passagens (HORWITZ *et al.*, 1999; PITTENGER *et al.*, 1999).

As células são mantidas em incubadora a 37°C com 5% CO₂, o que facilita a manutenção do pH do meio, permitindo que as trocas das células com o meio sejam mais eficientes (FRESHNEY, 1994). Diversos meios de cultivo já foram testados para manutenção das CTMs (Tabela 1) e essa variável representa um fator importante para o crescimento e diferenciação das CTMs.

Os meios mais comumente utilizados são os meios contendo solução balanceada de sais como MEM, Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco (DMEM), RPMI-1640 (desenvolvido no Instituto Memorial Parque Roswell), Meio Basal de Eagle (BME), Meio Essencial Mínimo de Dulbecco/Mistura de Nutriente de Ham F-12 (DMEM/F-12), com adição de Soro Fetal Bovino (SFB), normalmente na concentração de 10-20% (TAPP *et al.*, 2009).

Tabela 1 – Meios de cultivo e concentrações de SFB utilizados para cultivo das CTMs.

Espécie animal	Meio e suplementação utilizados	Referência
Cão	K-NAC 5% SFB	NEUPANE <i>et al.</i> , 2008
Cão	50%DMEM 50%Ham-F12 10 SFB	CSAKI <i>et al.</i> , 2007
Cão	IMDM 2% SFB	SUTER <i>et al.</i> , 2004
Camundongo	DMEM/F12 5% SFB	YAMAMOTO <i>et al.</i> , 2007
Camundongo	DMEM 10% SFB	SUNG <i>et al.</i> , 2008
Camundongo	DMEM-LG 10% SFB	TROPEL <i>et al.</i> , 2004
Humano	α -MEM 20% SFB	BUNNEL <i>et al.</i> , 2008
Humano	58% DMEM-LG 40% MCDB201 2% SFB	WAGNER <i>et al.</i> , 2005
Humano	α -MEM 17% SFB	DVORAKOVA <i>et al.</i> , 2008
Gato	DMEM 10% SFB	MARTIN <i>et al.</i> , 2002

CTMs: células tronco mesenquimais; DMEM-LG: Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco – Baixa Glicose; IMDM: Modificação de Iscove do meio de Eagle; α -MEM: Meio Essencial Mínimo, modificação alfa; SFB: soro fetal bovino; K-NAC: meio MCDB 153 modificado, suplementado com N-acetil-L-cisteína.

A concentração de SFB afeta a proliferação das CTMs por conter diversas citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas e fator de crescimento epidermal (TAPP *et al.*, 2009).

Os esquemas de trocas de meio e o número de passagens antes do início da indução à diferenciação também variam de acordo com o protocolo utilizado, mas o mais comum são trocas de meio a cada três dias e início da indução após a 3ª ou 4ª passagem (TROPEL *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2006; BUNNELL *et al.*, 2008; NEUPANE *et al.*, 2008; SUNG *et al.*, 2008).

Existe um único relato de estudo sobre a senilidade das CTMs do tecido adiposo de cães. Nesse estudo, dois meios foram testados para avaliar longevidade e potencial de proliferação das células. As células mantiveram-se viáveis por 83 dias, após oito passagens, em meio de cultivo K-NAC (meio MCDB-53 modificado, suplementado com N-acetil-L-cisteína) com 5% SFB. O potencial de proliferação foi muito superior para as células mantidas em uma mistura de 1:1 de meios K-NAC e “D-Medium” (Meio Essencial Mínimo de Eagle modificado), com 5% SFB: 66 dias

após nove passagens, com concentração celular inicial de 400 células/cm² (NEUPANE *et al.*, 2008).

3.3. DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO

A diferenciação das CTMs pode ser induzida pela adição de misturas específicas de indutores químicos ou citocinas (BUNNELL *et al.* 2008), adicionados ao meio de cultivo.

As CTMs tipicamente se diferenciam em três linhagens da mesoderme: osteogênica, condrogênica e adipogênica. Porém, estudos já foram realizados relatando o potencial dessas células em se diferenciarem em células epiteliais, da musculatura lisa e esquelética, endoteliais, cardíacas, hematopoiéticas e cartilaginosas, assim como células da endoderme (hepatócitos) e ectoderme (células do sistema nervoso central) (KRAMPERA *et al.*, 2006; BUNNEL *et al.*, 2008).

Para indução à diferenciação em osteoblastos a maioria dos protocolos inclui o uso da dexametasona e do β -glicerol fosfato em concentrações variadas. É utilizado ainda o ácido ascórbico, ascorbato de sódio-2-fosfato ou L-ácido ascórbico 2-fosfato, também em concentrações variáveis de acordo com o protocolo utilizado (BUNNELL *et al.*, 2008; CSAKI *et al.*, 2007; NEUPANE *et al.*, 2008; TROPEL *et al.*, 2004; VIDAL *et al.*, 2007).

A indução à diferenciação em condrócitos tem na grande maioria dos protocolos os indutores TGF- β 1 (fator de crescimento e transformação β) ou TGF- β 3, Asc 2P (L-ácido ascórbico 2-fosfato) e insulina, com algumas variações nas concentrações (BUNNELL *et al.*, 2008; CSAKI *et al.*, 2007; NEUPANE *et al.*, 2008). Alguns protocolos incluem a prolina (TROPEL *et al.*, 2004), dexametasona, piruvato de sódio (BUNNELL *et al.*, 2008; CSAKI *et al.*, 2007; TROPEL *et al.*, 2004) ou BMP (proteína morfogênica óssea) (BUNNELL *et al.*, 2008), também em concentrações variadas.

Para a linhagem adipocítica, os principais protocolos utilizam IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) (BUNNELL *et al.*, 2008; CSAKI *et al.*, 2007; NEUPANE *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2007), dexametasona, indometacina e insulina (CSAKI *et al.*, 2007; NEUPANE *et al.*, 2008). Alguns protocolos utilizam também a glutamina (TROPEL *et al.*, 2004), biotina ou rosiglitazona (VIDAL *et al.*, 2007). As

concentrações desses indutores também sofrem variações de acordo com o protocolo.

A indução tem início a partir da 3ª ou 4ª passagem (TROPEL *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2006; BUNNELL *et al.*, 2008; NEUPANE *et al.*, 2008; SUNG *et al.*, 2008), quando as células são tripsinizadas e transferidas para placas de cultivo ou tubos cônicos, de acordo com a linhagem induzida.

A diferenciação para osteoblastos e adipócitos é realizada em placas de cultivo com seis, 12 ou 24 poços. A indução para cada uma dessas linhagens é feita em triplicata, usando-se três poços para teste e três poços para controle. A diferenciação para condrócitos é realizada em tubos cônicos, após centrifugação das células tripsinizadas, em sistema de cultura em botão (SEKIYA *et al.*, 2001).

Diferentes protocolos de indução à diferenciação nas três linhagens da mesoderme (óssea, adiposa e cartilaginosa) foram testados por diferentes autores, com variações de concentrações e substâncias químicas indutoras (Tabela 2).

Tabela 2 – Meios de diferenciação utilizados para cultivo das CTMs isoladas de tecido adiposo e medula óssea, nos diferentes animais e humano

Origem	Espécie	Indução	Meio base	Enriquecimento do meio	Referência
Tecido adiposo	Cão	Osteogenese	D medium 10% SFB	Dexametasona (0,1 mM) Asc 2P (50 µM) β-GF de sódio (10 mM)	NEUPANE <i>et al.</i> , 2008
Tecido adiposo	Cão	Condrogenese	D medium 10% SFB	TGF-β1 (10 ng/mL) Asc 2P (50 µM) Insulina (6,25 µg/mL)	NEUPANE <i>et al.</i> , 2008
Tecido adiposo	Cão	Adipogenese	D medium 10% SFB	IBMX (500 µM) Dexametasona (1 µM) Indometacina (100 µM) Insulina (10 µg/mL)	NEUPANE <i>et al.</i> , 2008
Medula óssea	Cão	Osteogenese	DMEM 10% SFB	Dexametasona (10^{-7} M) Asc 2P (50 µM) β-GF (10 mM)	CSAKI <i>et al.</i> , 2007
Medula óssea	Cão	Condrogenese	DMEM 10% SFB	TGF-β1 (10 ng/mL) Asc 2P (0,1mM) Insulina (10 µg/mL) Dexametasona (10^{-7} M)	CSAKI <i>et al.</i> , 2007
Medula óssea	Cão	Adipogenese	DMEM 10% SFB	IBMX (1 mM) Dexametasona (1 µM) Indometacina (0,2 mM) Insulina (0,1 mg/mL)	CSAKI <i>et al.</i> , 2007
Medula óssea	Murina	Osteogenese	Complete medium	Dexametasona (10^{-8} M) β-GF (10 mM) Ácido ascórbico (0,3 mM)	TROPEL <i>et al.</i> , 2004
Medula óssea	Murina	Condrogenese	DMEM-HG	Dexametasona (10^{-7} M) Piruvato de sódio (1 mM) Asc 2P ($1,7 \times 10^{-4}$ M) Prolina (35 mM)	TROPEL <i>et al.</i> , 2004
Medula óssea	Murina	Adipogenese	DMEM-HG 40% Ham F12 50% Soro de rato 10%	Dexametasona (10^{-8} M) Insulina (0,5 µg/mL) Glutamina (2 mM)	TROPEL <i>et al.</i> , 2004
Tecido adiposo	Cavalo	Adipogenese	DMEM/F12 3% SFB 5% Soro de coelho	Insulina (1 µmol/L) Dexametasona (1 µmol/L) IBMX (0,5 mmol/L) Biotina (33 µmol/L) Rosiglitazona (5 µmol/L)	VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Tecido adiposo	Cavalo	Osteogenese	DMEM/F12 10% SFB	Dexametasona (20 nmol/L) β-glicerolfosfato (10 mmol/L) Ascorbato de sódio 2-fosfato (50 µg/mL)	VIDAL <i>et al.</i> , 2007
Tecido adiposo	Humana	Adipogenese	DMEM 20% SFB	IBMX (0,5 mM) Indometacina (50 µM) Dexametasona (0,5 µM)	BUNNELL <i>et al.</i> , 2008
Tecido adiposo	Humana	Osteogenese	DMEM 20% SFB	Dexametasona (1 nM) Asc 2P (50 µM) β-glicerolfosfato (2 mM)	BUNNELL <i>et al.</i> , 2008
Tecido adiposo	Humana	Condrogenese	DMEM 1,25 mg/mL SFB	BMP (500 ng/mL) TGF-β3 (10 ng/mL) Dexametasona (10^{-7} M) Asc 2P (50 µg/mL) Insulina(6,25 µg/mL)	BUNNELL <i>et al.</i> , 2008

IBMX: 3-isobutil-1-metilxantina; SFB: soro fetal bovino; CTMs: células tronco mesenquimais; DMEM: Meio de essencial modificado por Dulbecco; Asc 2P: L-ácido ascorbico 2-fosfato; TGF-β: Fator de crescimento e transformação- β; BMP: Proteína morfogênica óssea; D-medium: Meio essencial mínimo de Eagle modificado; β-GF: β-glicerolfosfato.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

A caracterização das CTMs é importante para confirmação que as células isoladas são as células com que se deseja trabalhar.

O padrão ouro para caracterização das CTMs foi definido por PITTINGER *et al* (1999) como fibroblastos capazes de se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica. Porém, mais recentemente, DOMINICI *et al* (2006) propuseram três critérios para identificação das CTMs: aderência à superfícies plásticas; potencial de diferenciação multipotente em osteoblastos, adipócitos e condroblastos e expressão de marcadores de superfícies específicos.

A expressão de antígenos de superfície tem sido usada extensivamente na imunologia. As categorias típicas de marcadores de superfície expressos nas CTMs são: moléculas de adesão como integrinas (CD29, CD49e), receptores de moléculas como hialuronato (CD44), caderinas (CD144), enzimas de superfície (CD73), proteínas da matriz extracelular (CD90, CD105), moléculas de adesão intracelular (CD54), moléculas de adesão vascular (CD106), proteínas reguladoras do complemento e antígenos de histocompatibilidade (GIMBLE & GUILAK, 2003; STREM *et al.*, 2005).

As CTMs devem se apresentar positivas para CD105, CD73 e CD90, mas negativas para os marcadores hematopoiéticos CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α , CD19 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006). Porém, CD90, CD34, CD106, CD105 e Stro-1 são variavelmente expressos em CTMs do tecido adiposo de humanos e de animais, principalmente em passagens iniciais das células (GRONTHOS *et al.*, 2001; KATZ *et al.*, 2005; KOLF *et al.*, 2007; MITCHELL *et al.*, 2006; VARMA *et al.*, 2007).

É importante observar que não existe, atualmente, distinção bem definida entre os marcadores de superfície para CTMs do tecido adiposo, CTMs da medula óssea e fibroblastos (HANIFFA *et al.*, 2007). As CTMs do tecido adiposo e CTMs da medula óssea apresentam muita semelhança na expressão dos marcadores (YAÑEZ *et al.*, 2006). Embora existam algumas semelhanças funcionais entre fibroblastos humanos de adultos e CTMs, como marcadores de superfície característicos e algumas habilidades de diferenciação (HANIFFA *et al.*, 2007), a

caracterização extensiva demonstra muitas diferenças funcionais (PITTINGER *et al.*, 1999; WAGNER *et al.*, 2005).

A caracterização da expressão de marcadores para CTMs de animais é desafiadora porque marcadores comerciais não estão disponíveis para as diferentes espécies, e nem todos os anticorpos de humanos e murinos apresentam reação cruzada com as outras espécies (TAPP *et al.*, 2009).

3.5. APLICAÇÃO E TERAPIA CELULAR

O termo terapia celular descreve um conjunto de métodos e abordagens tecnológicas fundamentadas no conhecimento de várias ciências, que visam à utilização de células para o tratamento de doenças. O principal foco atual de interesse da terapia celular é a medicina regenerativa, em que se busca a substituição de células ou tecidos, lesados ou perdidos, para restauração de sua função (ZAGO, 2005).

A atenção despertada por essa possibilidade se dá principalmente pelo fato dessas lesões, alvos de tratamento da terapia celular, serem as principais causas de morte e morbidade das sociedades modernas, como doenças cardíacas, diabetes melito, câncer, pneumopatias e doenças genéticas (ZAGO, 2005), e a estimulação osteogênica para o tratamento de não união de fraturas (ZAMPROGNO, 2007).

Porém, essa modalidade de terapia ainda necessita de muito estudo e aperfeiçoamento, principalmente para responder questões como a concentração celular ideal necessária e compreensão do processo de diferenciação *in vivo* das células tronco injetadas (ZAMPROGNO, 2007).

Dentre as diferentes modalidades de terapia celular, a engenharia tecidual com o uso e manipulação das CTMs é uma nova modalidade de tratamento que pode ser aplicada em uma grande variedade de lesões e doenças (POUNTOS, 2007) e tem sido, atualmente, o principal foco de estudo nessa área (ZAGO, 2005). As suas principais vantagens incluem a reparação do tecido com regeneração de alta qualidade sem a formação de tecido fibroso. Quando comparado com os autoenxertos de osso e cartilagem utilizados atualmente, os danos no local de coleta das CTMs são mínimos. Outra grande vantagem é o baixíssimo risco de rejeição e transmissão de doenças por se tratar de um autotransplante (POUNTOS, 2007).

Na engenharia tecidual, existem quatro principais estratégias utilizadas (POUNTOS, 2007):

- Uso de células não fracionadas da medula óssea;
- CTMs expandidas por cultivo celular;
- Células diferenciadas;
- Células geneticamente modificadas.

Com exceção do uso de células não fracionadas da medula óssea, todas as outras consistem de um ciclo de eventos que se inicia com o isolamento das células, cultivo até que o número de células desejado seja atingido e devolução dessas células ao local lesionado (POUNTOS, 2007).

As CTMs representam uma fonte ideal de células tronco para terapia celular devido à sua fácil purificação, expansão e característica multipotencial (TROPEL *et al.*, 2004). Inicialmente acreditava-se que o uso das CTMs na engenharia tecidual teria seu uso restrito a tecidos como osso, gordura, cartilagem e ligamentos, músculo e estroma medular devido à sua origem mesenquimal.

Entretanto, com base nos resultados de diversos estudos pré-clínicos, que demonstraram a recuperação da função tecidual em uma grande variedade de tecidos lesionados após o transplante das CTMs sem diferenciação significativa das células injetadas em fenótipos adequados a cada tecido, um mecanismo de ação alternativo foi proposto. A teoria de que as CTMs estimulam recuperação e regeneração do hospedeiro pela secreção de inúmeros fatores pró-regenerativos vem sendo aceita. Estudos *in vitro* relataram a secreção de diversos fatores antiinflamatórios, angiogênicos, neurotróficos, imunomodulatórios e antifibróticos pelas CTMs (WAGNER *et al.*, 2009).

Atualmente, estudos na área de terapia celular vêm sendo realizados em animais, com o objetivo de aprimorar e aperfeiçoar as técnicas para que futuramente sejam aplicadas em humanos. Em cavalos, há um relato de estudo sobre a regeneração de tendão com uso de células tronco (RICHARDSON *et al.*, 2007). Em ratos, estudos vêm sendo realizados na área de cirurgia cardiovascular, com transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio (GUARITA-SOUZA, *et al.*, 2005) e o transplante de células mioblásticas esqueléticas e CTMs na miocardiopatia isquêmica (BROFMAN *et al.*, 2004). Na

medicina, estudos clínicos também vêm sendo realizados, principalmente para o tratamento de cardiopatia isquêmica (ASSMUS *et al.*, 2003; PERIN *et al.*, 2003; PERIN *et al.*, 2004; STRAUER *et al.*, 2002; WOLLERT *et al.*, 2004).

No Brasil, está em andamento o Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular para avaliação da eficácia da terapia celular nas seguintes doenças: infarto agudo do miocárdio, doença isquêmica crônica, cardiomiopatia dilatada e cardiomiopatia chagásica (CARVALHO, 2009).

4. REFERÊNCIAS

ASSMUS, B.; SCHACHINGER, V.; TEUPE, C.; BRITTEN, M.; LEHMANN, R.; DOBERT, N.; GRUNWALD, F.; AICHER, A.; URBICH, C.; MARTIN, H.; HOELZER, D.; DIMMELER, S.; ZEIHNER, A. M. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). **Circulation**, v. 106, p. 3009–3017, 2002.

AWAD, H. A.; BUTLER, D. L.; BOIVIN, G. P.; SMITH, F. N.; MALAVIYA, P.; HUIBREGTSE, B.; CAPLAN, A. I. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon, **Tissue Engineering**, v.5, n.3, p.267–277, 1999.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A.P.E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, n.14, v.1, p.22-24, 2006.

BROFMAN, P. R.; CARVALHO, K. A.; GUARITA-SOUZA, L. C.; REBELATTO, C.; HANSEN, P.; SENEGAGLIA, A. C.; MYAGUE, N.; FURUTA, M.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M. Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v.19, n.3, p.261-266, 2004.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolations, expansion and differentiation. **Methods**, v.45, p.115-120, 2008.

CARVALHO, A. C. C. Estamos tão atualizados como os países desenvolvidos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/reportagensEspeciais/default.cfm?pg=detail&id_area=124&CO_NOTICIA=10049>, 31/03/2009. Acesso em 07/02/2010. Entrevista.

CARVALHO, A. M.; ALVEZ, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSINI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.132, p.303-306, 2009.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, v.33, n.8, p.811-821, 2009.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.128, n.6, p.507-520, 2007.

CUI, L.; LIU, B.; LIU, G.; ZHANG, W.; CEN, L.; SUN, J.; YIN, W.; LIU, W.; CAO, Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. **Biomaterial**, v.28, p.5477-5486, 2007.

DEVINE, S. M.; BARTHOLOMEW, A. M.; MAHMUD, N.; NELSON, M.; PATIL, S.; HARDY, W.; TURGEON, C.; HEWETT, T.; CHUNG, T.; STOCK, W.; SHER, D.; WEISSMAN, S.; FERRER, K.; MOSCA, J.; DEANS, R.; MOSELEY, A.; HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion, **Experimental Hematology**, v.29, n.2, p. 244–255, 2001.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MULLER, E.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p. 315-317, 2006.

DVORAKOVA, J.; HRUBA, A.; VELEBNY, V.; KUBALA, L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. **Cell Biology International**, v.32, p.1116-1125, 2008.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUEL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology**, v.109, n.1, p.235-242, 2000.

ESLAMINEJAD, B.M.R.; NIKMAHZAR, A.; TAGHIYAR, L.; DEHGHAN, M.H.; KAZEMI, H.; FAROKHI, A.; YAZDI, P.E. Osteogenic, chondrogenic and adipogenic potentials of canine marrow-derived mesenchymal stem cells, **Yakhteh Medical Journal**, v.8, n.1, p.31-38, 2007.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animals Cells: A Manual of Basic Technique** – 4th Edition, New York, 1994, 672p.

FRIEDENSTEIN, A. J. P. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **The Journal of Embryological Experimental Morphology**, v.16, p.381-390, 1966.

GIMBLE, J. M.; GUILAK, F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. **Cytotherapy**, v.5, n.5, p.362-369, 2003.

GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D. M.; LEDDY, H. A.; ROBEY, P. G.; STORMS, R. W.; GIMBLE, J. M. **Journal of Cellular Physiology**, v.189, n.1, p. 54-63, 2001.

GUARITA-SOUZA, L. C.; CARVALHO, K. A. T.; REBELATTO, C.; SENEGAGLIA, A.; HANSEN, P.; FURUTA, M.; MIYAGUE, N.; FRANCISCO, J. C.; OLANDOSKI, M.; WOITOWICZ, V.; SIMEONI, S.; FARIA-NETO, J. R.; BROFMAN, P. A comparação entre o transplante de células tronco mononucleares e mesenquimais no infarto do miocárdio. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.20, n.3, p.270-278, 2005.

HANIFFA, M. A.; WANG, X. N.; HOLTICK, U.; RAE, M.; ISAACS, J. D.; DICKINSON, A. M.; HILKENS, C. M.; COLLIN, M. P. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. **The Journal of Immunology**, v.179, p.1595-1604, 2007.

HORWITZ, E.M.; PROCKOP, D.J.; FITZPATRICK, L.A.; KOO, W.W.; GORDON, P.L.; NEEL, M.; SUSSMAN, M.; ORCHARD, P.; MARX, J.C.; PYERITZ, R.E.; BRENNER, M.K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v.5, n.3, p.309-313, 1999.

IN'T ANKER, P. S.; NOORT, W. A.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN der KEUR, C.; KRUISSELBRINK, A. B.; van BEZOOIJEN, R. L.; BEEKHUIZEN, W.; WILLEMZE, R.; KANHAI, H. H.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. **Haematologica**, v.88, n.8, p.845-852, 2003.

IN'T ANKER, P. S.; SCHERJON, S. A.; KLEIJBURG-VAN der KEUR, C.; de GROOT-SWINGS, G. M.; CLAAS, F. H.; FIBBE, W. E.; KANHAI, H. H. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal and maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v.22, n.7, p.1338-1345, 2004.

JESSOP, H. L.; NOBLE, B. S.; CRYER, A. The differentiation of a potential mesenchymal stem cell population within ovine bone marrow. **Biochemical Society Transactions**, v.22, n.3, p.248S, 1994.

KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S. P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. **Tissue engineering**, v.3, n.2, p.173-185, 1997^a.

KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell transplant**, vol.6. n.2, p.125-134, 1997^b.

KATZ, A. J.; THOLPADY, S. S.; SHANG, H.; OGLE, R. C.; Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. **Stem Cells**, v.23, n.3, p.412-423, 2005.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research and Therapy**, v.9, n.1, p.204, 2007.

KRAMPERA, M.; PIZZOLA, G.; APRILI, G.; FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v.39, p. 678-683, 2006.

LEE, R. H.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H. S.; SUH, K; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.14, p.311-324, 2004.

LENNON, D.P.; CAPLAN, A.I. Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v.34, p.1606-1607, 2006.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental hematology**, v.30, p.879-886, 2002.

MITCHELL, J. B.; McINTOSH, K.; ZVONIC, S.; GARRET, S.; FLOYD, Z. E.; KLOSTER, A.; DI, H. Y.; STORMS, R. W.; GOH, B.; KILROY, G.; WU, X.; GIMBLE, J. M. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cells-associated markers. **Stem Cells**, v.24, n.2, p.376-385, 2006.

MOSCA, J. D.; HENDRICKS, J. K.; BUYANER, D.; DAVIS-SPROUL, J.; CHUANG, L. C.; MAJUMDAR, M. K.; CHOPRA, R.; BARRY, F.; MURPHY, M.; THIEDE, M. A.; JUNKER, U.; RIGG, R. J.; FORESTELL, S. P.; BOHNLEIN, E.; STORB, R.; SANDMAIER, B. M. Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. In: Orthopaedics Gene Therapy, 2000, Florida, EUA. **Clinical Orthopaedics and related research**, suplemento nº379, 2000, p.S71-S90.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. **Tissue Engineering: Part A**, volume 14, n.6, p.1007-1015, 2008.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUSA, A. L.; MESQUITA, C. T.; ROSSI, M. I.; CARVALHO, A. C.; DUTRA, H. S.; DOHMANN, H. J.; SILVA, G. V.; BELEM, L.; VIVACQUA, R.; RANGEL, F. O.; ESPORCATTE, R.; GENG, Y. J.; VAUGHN, W. K.; ASSAD, J. A.; MESQUITA, E. T.; WILLERSON, J. T. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. **Circulation**, v. 107, p. 2294–2302, 2003.

PERIN, E. C.; DOHMANN, H. F.; BOROJEVIC, R.; SILVA, S. A.; SOUSA, A. L.; SILVA, G. V.; MESQUITA, C. T.; BELEM, L.; VAUGHN, W. K.; RANGEL, F. O.; ASSAD, J. A.; CARVALHO, A. C.; BRANCO, R. V.; ROSSI, M. I.; DOHMANN, H. J.; WILLERSON, J. T. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. **Circulation**, v. 110, n.11, suppl.1, p. II213–218, 2004.

PHINNEY, D.G.; KOPEN, G.; ISAACSON, R.L.; PROCKOP, D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth and differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.72, n.4 p.570-585, 1999.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p. 143-147, 1999.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMRY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. **Injury**, International Journal of the Care of the Injured, volume 38, suplemento 4, p.23-33, 2007.

REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, M. P.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v.233, p.901-913, 2008.

RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. **TRENDS in Biotechnology**, v.25, n.9, p.409-416, 2007.

RINGE, J. ; KAPS, C.; SCHMITT, B.; BUSCHER, K.; BARTEL, J.; SMOLIAN, H.; SCHULTZ, O.; BURMESTER, G. R.; HAUPL, T.; SITTINGER, M. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. **Cell Tissue Research**, v.307, n.3, p.321– 327, 2002.

RODBELL, M. Metabolism of isolated fat cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.239, n.2, p.375-380, 1966.

ROUFOSSE, C. A.; DIREKZE, N. C.; OTTO, W. R.; WRIGHT, N. A.; Circulating mesenchymal stem cells. **The International Journal of Biochemistry and Cellular Biology**, v.36, n.4, p.585-597, 2004.

SCHWARZ, E. J.; ALEXANDER , G. M.; PROCKOP , D. J.; AZIZI ,S. A. Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. **Human Gene Therapy**, v.10, n.15, p.2539–2549, 1999.

SEKIYA, I.; COLTER D.C.; PROCKOP, D.J. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v.284, n.2, p.411-418, 2001.

SHAMBLOTT, M. J.; AXELMAN, J.; WANG, S.; BUGG, E. M.; LITTLEFIELD, J. W.; DONAVAN, P. J.; BLUEMENTHAL, P. D.; HUGGINS, G. R.; GEARHART, J. D. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, v.95, n.23, p.13726-13731, 1998.

SHIH, D. T.; LEE, D. C.; CHEN, S. C.; TSAI, R. Y.; HUANG, C. T.; TSAI, C. C.; SHEN, E. Y.; CHIU, W. T. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cell in human scalp tissue. **Stem Cells**, v. 23, n.7, p.1012-1020, 2005.

SILVEIRA, A. C. C.; LIMA, R. S.; PENHA, E. M.; MACAMBIRA, S. G.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; BARROUIN-MELO, S. M.; AGUIAR, P. H. P. Harvest and characterization of mesenchymal canine stem cells from adipose tissue and bone marrow. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, 2009, Ouro Preto. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, 2009, p.342.

STRAUER, B. E.; BREHM, M.; ZEUS, T.; KOSTERING, M.; HERNANDEZ, A.; SORG, R. V.; KOGLER, G.; WERNET, P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. **Circulation**, v.106, p.1913–1918, 2002.

STREM, B. M.; HEDRICK, M. H. The growing importance of fat in regenerative medicine. **Trends in Biotechnology**, v.23, p.64-66, 2005.

STREM, B. M.; HICOK, K. C.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z.; SCHREIBER, R. E.; FRASER, J. K.; HEDRICK, M. H. Multipotential differentiation of adipose tissue derived stem cells. **The Keio Journal of Medicine**, v.54, n.3, p.132-141, 2005.

SUNG, J.H.; YANG, H.-M.; PARK, J.B.; CHOI, G.-S.; JOH, J.-W, KWON, C.H.; CHUN, J.M., LEE, S.-K.; KIM, S.-J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation proceedings**, v. 40, p.2649-2654, 2008.

SUTER, S.E.; GOUTHRO, T.A.; MCSWEENEY, P.A.; NASH, R.A.; HASKINS, M.E.; FELSBURG, P.J.; HENTHORN, P.S. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34⁺ cells. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 101, p.31-47, 2004.

TAPP, H.; HANLEY JR, E.N.; PATT, J.C.; GRUBER, H.E. Adipose-derived stem cells: characterization and current applications in orthopaedic tissue repair. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.1-9, 2009.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHAL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v.282, p.1145-1147, 1998.

TROPEL, P.; NÖEL D.; LEGRAND P.; BENABID, A.; BERGER, F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell from adult mouse bone marrow. **Experimental cell research**, v.295, p.395-406, 2004.

TRUBIANI, O.; DI PRIMO, R.; TRAINI, T.; PIZZICANNELLA, J.; SCARANO, A.; PIATELLI, A.; CAPITU, S. Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded ex vivo from periodontal ligament. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.18, p.213-221, 2005.

VALÉE, M.; CÔTÉ, J-F.; FRADETTE, J. Adipose-tissue engineering : Taking advantage of properties of human adipose-derived stem/stromal cells. **Pathologie Biologie**, v.57, p.309-317, 2009.

VARMA, M. J.; BREULS, R. G.; SCHOUTEN, T. E.; JURGENS, W. J.; BONTKES, H. J.; SCHUURHUIS, G. J.; van MILLIGEN, F. J. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. **Stem Cells and Development**, v.16, n.1, p.91-104, 2007.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v. 36, p.613-622, 2007.

WAGNER, J.; KEAN, T.; YOUNG, R.; DENNIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.531-536, 2009.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v.33, p.1402-1416, 2005.

WAKITANI, S.; GOTO, T.; PINEDA, S. J.; YOUNG, R. G.; MANSOUR, J. M.; CAPLAN, A. I.; GOLDBERG, V. M. Mesenchymal cell-based repair of large fullthickness defects of articular cartilage, **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v.76, n.4, p. 579– 592, 1994.

WOLLERT, K. C.; MEYER, G. P.; LOTZ, J.; RINGES-LICHTENBERG, S.; LIPPOLT, P.; BREIDENBACH, C.; FICHTNER, S.; KORTE, T.; HORNIG, B.; MESSINGER, D.; ARSENIIEV, L.; HERTENSTEIN, B.; GANSER, A.; DREXLER, H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. **Lancet**, v. 364, p. 141–148, 2004.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v.61, n.4, p.364-370, 2000.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.-I.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of Dermatological Science**, v.48, n.1, p.43-52, 2007.

YAÑEZ, R.; LAMANA, M. L.; GARCÍA-CASTRO, J. ; COLMENERO, I. ; RAMÍREZ, M. ; BUEREN, J. A. ; Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. **Stem Cells**, v.24, n.11, p.2582-2591, 2006.

ZAGO, M. A. Terapia com células tronco: fundamentos, oportunidades e obstáculos. **Revista da sociedade brasileira de hipertensão**, v.8, n.4, p.145-150, 2005.

ZAMPROGNO, H. Aplicabilidade das Células tronco na ortopedia veterinária. In: Congresso Brasileiro da Anclivepa, XXVIII., 2007, Florianópolis. **Anais do XXVIII Congresso Brasileiro da Anclivepa**, 2007, p74-76.

ZHANG, Z.Q.; JIN, Y.; LI, Y.Q.; ZHANG, Y.J. Isolation, culture and multi-directional differentiation potency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v.11, n.42, 2007.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H. P.; HEDRICK, M. H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v.7, n.2, p.211-228, 2001.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; De UGARTE, D. A.; HUANG J.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, n., p.4279-4295, 2002.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO, CULTIVO E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSE DE CÃES

ISOLATION, CULTURE AND DIFFERENTIATION OF CANINE ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

RESUMO

O uso de células tronco mesenquimais (CTMs) vem se tornando cada vez mais promissor na medicina regenerativa e engenharia tecidual por estarem disponíveis em tecidos adultos e por sua capacidade de se diferenciarem em diferentes linhagens celulares. O isolamento das CTMs pode ser realizado de animais adultos, de diferentes tecidos de origem, como tecido adiposo. O objetivo desse estudo foi o isolamento das CTMs do tecido adiposo de cães, seu cultivo e diferenciação. Foram coletadas amostras de tecido adiposo subcutâneo de cinco cães. As amostras foram processadas para o isolamento das CTMs, que foram cultivadas, expandidas e submetidas à diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Foram realizados estudos de cinética do crescimento celular e viabilidade celular. A avaliação da diferenciação foi realizada pela citoquímica e determinação da atividade da fosfatase alcalina. Foram isoladas e caracterizadas com sucesso CTMs das amostras de tecido adiposo coletadas. No isolamento foram obtidas em média 146.803 células/g de tecido adiposo e durante o cultivo, nas passagens, foram obtidas em média $1,87 \times 10^6$ células/mL. A atividade média da fosfatase alcalina para o grupo controle e para o grupo de diferenciação foi de 106,5 UI/L e 29,7 UI/L. Na avaliação dos osteoblastos foram observados depósitos de matriz extracelular, nos adipócitos foram observados vacúolos com gotículas de gordura e nos condrócitos foram observados os mucopolissacarídeos da matriz intracelular. O tecido adiposo do cão é uma boa fonte das CTMs, que são diferenciadas nas linhagens adipocítica, condrocítica e osteoblástica.

PALAVRAS-CHAVE: Células tronco mesenquimais, caracterização, citoquímica.

ABSTRACT

The applications of mesenchymal stem cells (MSC) are becoming increasingly more promising for regenerative medicine and tissue engineering fields. The increase in their uses is due to availability in adult tissues as well as due to its ability to differentiate into different cell lines. MSC can be isolated from adult animals from a variety of tissues, such as the adipose. This study focused on the isolation, culture and differentiation of MSC from canine adipose tissue. Samples of subcutaneous adipose tissue from five dogs were collected for this study. The MSC were isolated from the tissue samples, then cultured and differentiated into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Growth kinetics and viability studies were conducted and the evaluation of cell differentiation was performed by the cytochemistry and alkaline phosphatase analysis. The isolation and characterization of MSC from the adipose tissue samples collected were successful. The mean number of cells acquired in the isolation was 146,803 cells/g of adipose tissue and in culture the mean number of cells acquired in the passages was 1.87×10^6 cells/mL. The mean value for the alkaline phosphatase activity for the control group and for the differentiation group was 106.5 UI/L and 29.7 UI/L. We observed calcium accumulation in the osteoblasts, presence of intracellular matrix mucopolysaccharides in the chondrocytes and lipid-rich vacuoles in the adipocytes. Canine adipose tissue is a good source of MSC differentiated in the three lineages studied.

KEY WORDS: mesenchymal stem cells, characterization, cytochemistry

1. INTRODUÇÃO

A busca por melhores resultados para a reparação de grandes defeitos ósseos, resultantes de traumas ou de doenças, tem foco de pesquisas na medicina e na medicina veterinária (NEUPANE *et al.*, 2008). A engenharia tecidual e o transplante de células tronco surgiram como possibilidades promissoras de tratamento para essas alterações, principalmente com o uso das células tronco mesenquimais (CTMs) (NEUPANE *et al.*, 2008).

As CTMs são células multipotentes que podem ser encontradas em tecidos de animais adultos (POUNTOS *et al.*, 2007). A possibilidade de se trabalhar com células tronco que não sejam provenientes de tecidos embrionários e fetais tem diversas vantagens, entre elas a sua maior disponibilidade, facilidade de obtenção e conformidade com as questões éticas e legais.

As CTMs possuem potencial limitado quanto à variedade celular em que podem se diferenciar, diferente das células tronco embrionárias e fetais que são pluripotentes. As CTMs podem ser isoladas a partir de diferentes tecidos adultos como sangue periférico, tecido adiposo, medula óssea e músculo (CSAKI *et al.*, 2007).

As CTMs podem se diferenciar em diferentes tipos celulares da linhagem mesenquimal, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos (BARRY & MURPHY, 2004). As principais características dessas células são clonogenicidade, que é a habilidade de perceber a baixa densidade celular e ativar a capacidade de duplicação celular, multipotencialidade e autorrenovação, que é a capacidade de originar duas células: uma que se expandirá clonogenicamente ou se diferenciará e a outra que não se expandirá nem se diferenciará (ZAMPROGNO, 2007).

Os atuais avanços dos estudos na área da terapia celular com CTMs na medicina estão permitindo que essa realidade se aproxime da medicina veterinária no mundo e no Brasil. Os estudos e pesquisas no Brasil ainda são escassos e focados principalmente na medicina. Não existe até o presente momento relatos de isolamento das CTMs do tecido adiposo de cães no Brasil.

Os objetivos desse trabalho foram isolar, cultivar e diferenciar as células tronco do tecido adiposo de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Células tronco são caracterizadas por sua habilidade de autorrenovação e seu potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares (BUNNELL *et al.*, 2008). As células tronco de origem embrionária são pluripotentes, diferente das células tronco adultas, que são multipotentes, ou seja, possuem potencial mais restrito de diferenciação (BUNNELL *et al.*, 2008). Embora o uso de células tronco embrionárias apresente mais vantagem por sua pluripotencialidade, as questões éticas e legais tornam seu uso limitado (IM *et al.*, 2005).

A célula ideal para engenharia tecidual deve apresentar imunocompatibilidade e habilidade de autorrenovação. As CTMs, sendo multipotenciais, apresentam ambas as características. Vários estudos têm demonstrado que estas células podem ser utilizadas de forma alogênica sem problemas de rejeição (MINGUELL *et al.*, 2000; PITTINGER & MARTIN, 95) devido a sua baixa imunogenicidade, pois apresentam baixa expressão de antígenos MHC de classe I e ausência de expressão de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 e CD40 (PITTINGER & MARTIN, 95), além de estimular a proliferação de células T reguladoras CD4⁺ e CD25⁺, as quais atuam na indução e manutenção da tolerância periférica (LE BLAN & RINGDEN, 2007).

As CTMs tipicamente se diferenciam em três linhagens da mesoderme: osteogênica, condrogênica e adipogênica. Porém, estudos já foram realizados relatando o potencial dessas células em se diferenciarem em células epiteliais, da musculatura lisa e esquelética, endoteliais, cardíacas, hematopoiéticas e cartilaginosas, assim como células da endoderme (hepatócitos) e ectoderme (células do sistema nervoso central) (KRAMPERA *et al.*, 2006; BUNNEL *et al.*, 2008). As CTMs isoladas de tecidos adultos possuem potencial para se diferenciarem em tecido ósseo, tecido cartilaginoso, tecido adiposo e tecido muscular (IM *et al.*, 2005).

A fonte mais comum de coleta das CTMs é a medula óssea, porém outros tecidos como periósteo, músculos, membrana sinovial e tecido adiposo também são fontes dessas células (IM *et al.*, 2005).

A grande maioria dos estudos com CTMs utilizaram como tecido origem a medula óssea. Essas células já foram isoladas da medula óssea de animais como camundongo (BITTENCOURT *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2008; TROPEL *et al.*, 2004),

ratos (KADIYALA *et al.*, 1997^a; LENNON & CAPLAN, 2006), cavalos (RICHARDSON *et al.*, 2007) gatos (MARTIN *et al.*, 2002) e cães (CSAKI *et al.*, 2007; KADIYALA *et al.*, 1997^b; SUTER *et al.*, 2004).

O tecido adiposo adulto é uma fonte de células precursoras fibroblásticas, capazes de se diferenciarem em diversos tipos teciduais especializados (VIDAL *et al.*, 2007). Devido às atuais cirurgias estéticas em humanos, como a lipoaspiração, o tecido adiposo, nessa espécie, se tornou uma fonte importante das CTMs, abundante e de fácil acesso (IM *et al.*, 2005). Devido a essas vantagens em sua obtenção, o tecido adiposo tem tido crescente popularidade como fonte das CTMs e uso em terapias ortopédicas em pessoas (TAPP *et al.* 2009).

Estudos recentes com pessoas avaliando a eficácia da terapia com CTMs na doença do enxerto contra hospedeiro (DECH), doenças hepáticas, úlceras do pé diabético, lesões de pele, transplante de medula óssea, entre outras, tem demonstrado o potencial para o amplo uso terapêutico dessas células (WAGNER *et al.*, 2009).

Na medicina veterinária existem relatos de isolamentos das CTMs do tecido adiposo em cavalos (CARVALHO *et al.*, 2009; COLLEONI *et al.*, 2009), camundongos (MEIRELES *et al.*, 2006; YAMAMOTO, *et al.*, 2007) e cão (CUI *et al.*, 2007; NEUPANE *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2007).

CUI *et al* (2007) isolaram CTMs do tecido adiposo de um cão com o objetivo de investigar a possibilidade de cicatrização de grandes defeitos ósseos com o uso dessas células em próteses de coral. Nesse estudo, as células isoladas eram induzidas à diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos para confirmar serem CTMs. As células induzidas à diferenciação em osteoblastos eram semeadas nas próteses, que eram implantadas no local do defeito ósseo. Eram realizados dois defeitos ósseos craniais, bilaterais: um tratado com a prótese semeada com CTMs e o outro somente com a prótese. Os resultados foram melhores para o local implantado com a prótese semeada com CTMs.

NEUPANE *et al* (2008) isolaram CTMs do tecido adiposo de cães com o objetivo de caracterizá-las. A diferenciação nos três tipos de tecido (ósseo, cartilagenoso e adiposo) foi confirmada pela citoquímica, reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) e imunocitoquímica. Não foram realizadas caracterização morfológica e morfométrica das células nem avaliação da atividade da fosfatase alcalina.

SILVEIRA *et al* (2009) e ZHANG *et al* (2007) isolaram e diferenciaram as CTMs do tecido adiposo de cães, com objetivo de padronização da técnica.

Não existe no Brasil, até o momento, relato de isolamento das CTMs do tecido adiposo de cão. Os trabalhos existentes com CTMs de cães são escassos e tem como objetivo os avanços na terapia de doenças ósseas (CSAKI, *et al.*, 2007; CUI *et al.*, 2007; KADYIALA *et al.* 1997^b; NEUPANE *et al.*, 2008; SUTER *et al.*, 2004; ZAMPROGNO *et al.*, 2007; ZHANG, *et al.*, 2007). O foco principal dos trabalhos foi a utilização dos animais como modelo para procedimentos a serem realizados em humanos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados nesse experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (CEUA-SCA UFPR) protocolo número 017/2008.

3.1. ISOLAMENTO

Para realização desse trabalho foram coletadas cinco amostras de tecido adiposo de cães (Tabela 3). As amostras foram coletadas do tecido adiposo subcutâneo abdominal, no centro cirúrgico, durante a cirurgia de ovariectomia eletiva. Os cães eram hígidos, sendo quatro adultos e um jovem. Os animais eram submetidos a exames pré-operatórios laboratoriais e de imagem.

Tabela 3. Amostras de tecido adiposo subcutâneo coletadas de cães.

AMOSTRA	SEXO	IDADE	VOLUME COLETADO
I	F	3 ANOS	15 g
II	F	10 MESES	14 g
III	F	8 ANOS	22 g
IV	F	10 ANOS	20 g
V	F	8 ANOS	20 g

O protocolo utilizado para o isolamento das CTMs do tecido adiposo foi adaptado do utilizado por SHUTT *et al* (1996). Todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar vertical, com utilização de materiais estéreis.

As amostras de tecido adiposo coletadas foram armazenadas em frascos estéreis, com tampa e mantidas em temperatura ambiente, até o momento do processamento.

Primeiramente a amostra era colocada em placa de *petri* e lavada duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS) estéril. Após a lavagem, a amostra era macerada com auxílio de dois bisturis e então transferida para um frasco com solução de Colagenase tipo I (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) na concentração de 1 mg/mL, sendo uma parte de tecido adiposo para quatro partes da solução de colagenase para digestão enzimática, realizada a 37°C por 30 minutos, com agitação constante.

Após a digestão enzimática, o sobrenadante era desprezado e o restante da amostra transferido para tubo Falcon (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) de 50mL que era centrifugado a 2.500rpm por dez minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante era desprezado e eram adicionados 10mL de solução de PBS e feita nova centrifugação, a 1.000rpm, por dez minutos. O sobrenadante era novamente desprezado e as células ressuspensas com meio de cultivo DMEM/F12 (50% de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium e 50% de meio F12, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) para contagem, avaliação da viabilidade e plaqueamento das células. O plaqueamento foi realizado na concentração de 40.000 células/cm².

3.2. CULTIVO

As células isoladas eram plaqueadas e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ para crescimento e expansão até atingirem o número de células necessárias para o início da indução à diferenciação celular. O cultivo era realizado em frascos de poliestireno de 25 cm² (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland), com meio composto de 50% de Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco®, Invitrogen, NY, USA) e 50% de meio Mistura de Nutriente de Ham F-12 (F12, Gibco®, Invitrogen, NY, USA), com 15% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL; Gibco®, Invitrogen, NY, USA).

Após o início do cultivo, a primeira troca de meio era realizada com 48 ou 72h de cultivo para eliminação das células não aderidas, possibilitando a purificação das CTMs por aderência em plástico.

Durante o período de manutenção das células, o meio era trocado a cada três ou quatro dias. Os frascos de cultivo eram observados em microscópio invertido para avaliação da morfologia e do crescimento das células. Quando as células atingiam 80-85% de confluência, era feita a passagem (item 3.2.1.). Após as passagens, quando o número necessário de células para o início da indução era obtido, as células eram transferidas para as placas de 24 poços para a diferenciação celular.

O número necessário para o início da diferenciação foi definido com base nos protocolos previamente estabelecidos (DVORAKOVA, 2008): para as induções a osteoblastos e adipócitos, que foram realizadas em placas de cultivo, 30.000 células foram colocadas em cada poço destinado à diferenciação e controle. Dessa forma, a confluência desejada (80-85%) era obtida em 24h após a transferência das células para a placa. A indução a condrócitos foi realizada em tubos, em sistema de cultivo de micromassa, utilizando 200.00 células por tubo controle e diferenciação.

A cada passagem celular era realizada a contagem total das células e a avaliação da viabilidade (item 3.2.2).

3.2.1. PASSAGEM

A passagem das células era realizada quando a monocamada de células aderentes atingia 80-85% de confluência. Para o processo de passagem celular foi utilizada a tripsina 0,5% (Amresco, Solon, OH) para individualização das células, possibilitando dessa forma a transferência das células para outros frascos de cultivo e o aumento do número de células.

No procedimento era utilizado 1mL de tripsina para cada frasco de cultivo de 25 cm². A enzima era deixada em contato com as células por quatro minutos, a 37°C, depois era inativada com 1mL de soro fetal bovino. Em seguida as células eram transferidas para um tubo Falcon com 4mL de meio DMEM/F12 e centrifugadas a 1.500 rpm por dez minutos. O número total de células era contado em câmara de Neubauer, avaliava-se a viabilidade e então as células eram

plaqueadas em novos frascos de cultivo, em uma concentração média de $0,93 \times 10^6$ células/mL.

3.2.2. VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade das células era avaliada a cada procedimento de passagem celular com o objetivo de calcular a percentagem de células viáveis.

Para essa avaliação foi utilizado o corante azul de Tripan 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em solução salina. As células mortas apresentam alteração na permeabilidade da membrana permitindo que o corante penetre na célula. Dessa forma, é possível diferenciar no microscópio as células viáveis das não viáveis. As células não viáveis ficam com coloração azulada pela incorporação do corante.

Após a tripsinização, 50µL da solução de células diluídas em meio de cultura eram adicionados a 10µL da solução do corante por cinco minutos. Após esse tempo era realizada a contagem total das células em câmara de Neubauer e em seguida contagem das células não viáveis, que apresentavam coloração azulada. Com base nesses valores era calculada a percentagem de células viáveis.

3.2.3. CURVA DE CRESCIMENTO

A curva de crescimento foi realizada com as células da amostra III de tecido adiposo com o objetivo de avaliar a cinética do crescimento das células. Foram utilizadas células de terceira passagem.

Após a tripsinização as células foram contadas e foi preparada uma suspensão contendo 20.000 células/mL. As células foram distribuídas em 20 frascos de cultivo com 25 cm² de área de crescimento, que foram mantidos em incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

A cada 24h dois frascos eram removidos da incubadora e as células tripsinizadas para realização da contagem do número total e avaliação da viabilidade celular. O restante dos frascos eram mantidos na incubadora até o décimo dia e as trocas de meio eram realizadas a cada três ou quatro dias.

3.3. DIFERENCIAÇÃO

Para diferenciação foram utilizadas células entre a terceira e a sexta passagens, variando conforme a amostra atingisse o número de células desejado para o início da indução.

As células eram utilizadas a partir da terceira passagem, pois logo após o isolamento e no início do cultivo há muita contaminação com células da linhagem hematopoiética. Assim na terceira passagem, pela purificação das CTMs por aderência em plástico, a população de células já é mais homogênea, portanto seu potencial de diferenciação já é maior (BARRY & MURPHY, 2004; POUNTOS *et al.*, 2007).

O número de células utilizado foi de 30.000 células por poço para diferenciação em osteoblastos e adipócitos, e 200.000 células por tubo para condrócitos.

As amostras foram induzidas à diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. O período de indução era de 21 dias.

A indução à diferenciação em osteoblastos e adipócitos foi realizada em placas de poliestireno de 24 poços (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland). Dentro de cada poço utilizado para a indução foi colocada uma lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro (Glasstecnica, São Paulo, SP), previamente esterilizada. Após o plaqueamento das células nas placas era esperada a confluência de 80-85% para dar início a indução.

Para a diferenciação em condrócitos, a indução era feita em tubos Falcon (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) de 15 mL.

3.3.1. OSTEOLASTOS

A indução à diferenciação em osteoblastos foi feita em duplicata. Para cada amostra eram utilizados dois poços de uma placa com 24 poços e dois poços para controle.

O meio controle foi o mesmo meio utilizado para manutenção das células (DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino). O meio de diferenciação foi o DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino mais os indutores: dexametasona (0,1 $\mu\text{mol/L}$), β -glicerolfosfato (10 mmol/L) e ascorbato (50 $\mu\text{mol/L}$).

Os meios eram trocados três vezes por semana. A cada troca, o meio retirado era armazenado em tubos eppendorf (Oxygen, CA, EUA) para dosagem da fosfatase alcalina (item 3.3.4.2.).

3.3.2. ADIPÓCITOS

Para diferenciação em adipócitos foram testados dois meios de indução adipogênica e dois meios para controle. Cada meio foi testado em duplicata, utilizando-se dois poços da placa de 24 poços.

Para controle foram utilizados dois meios: o meio nº1, preparado no laboratório (DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino) e o meio nº2, meio comercial (MSCGM SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD). Os meios eram trocados três vezes por semana.

Para indução à diferenciação também foram utilizados dois meios diferentes. O meio nº1 continha os seguintes indutores: dexametasona (1 $\mu\text{mol/L}$), insulina (5 $\mu\text{g/mL}$) e indometacina (60 $\mu\text{mol/L}$), tendo como meio base DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino. O meio era trocado três vezes por semana.

O meio nº2 era um meio de diferenciação comercial para indução adipogênica (hMSC Adipogenic Induction SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD), contendo como agentes indutores a indometacina (0,4 mL), IBMX (Isobutilmetilxantina – 0,2 mL), insulina (2 mL), dexametasona (1 mL) e L-glutamina (4 mL) em 100 mL de meio. Esse meio foi utilizado alternadamente com um meio de manutenção (hMSC Adipogenic Maintenance SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD), segundo orientações do fabricante. O meio indutor era usado por três dias e o de manutenção por dois dias.

3.3.3. CONDRÓCITOS

A indução à diferenciação em condrócitos foi realizada em sistema de cultura de micromassa, em tubos Falcon de 15 mL, segundo protocolo descrito por SEKIYA *et al* (2001). A quantidade de 200.000 células era transferida para cada tubo e o tubo era centrifugado por dez minutos a 1.500 rpm. O meio sobrenadante era retirado e substituído pelo meio indutor ou controle. O botão de células era ressuspenso nesse meio e o tubo era novamente centrifugado. A indução era realizada com as células em forma de botão. Para cada amostra foram utilizados

dois meios de controle e dois meios de diferenciação. Os meios eram trocados três vezes por semana.

Para controle foram utilizados dois meios: o meio nº1, preparado no laboratório (DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino) e o meio nº2, meio comercial (MSCGM SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD).

Para indução à diferenciação também foram utilizados dois meios diferentes. O meio nº1 continha os seguintes indutores: TGF β 1 (Fator de transformação de crescimento β 1 – 10 ng/mL), insulina (0,5 μ g/mL) e ácido ascórbico (50 μ mol/L), tendo como meio base DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino. O meio era trocado três vezes por semana.

O meio nº2 era um meio de diferenciação comercial para indução condrogênica (hMSC Chondrogenic SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD), contendo como agentes indutores L-glutamina (4 mL), piruvato de sódio (2 mL), dexametasona (1 mL), prolina (2 mL), ascorbato (2 mL) e ITS (insulina, transferrina e selenito de sódio – 2 mL) em 100 mL de meio.

3.3.4. AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO

3.3.4.1. CITOQUÍMICA

Para avaliação citoquímica da diferenciação, as células foram coradas com corante específico para cada linhagem.

Para as induções realizadas nas placas de 24 poços, as lamínulas foram coradas dentro das placas. Após 21 dias de indução o meio era retirado e cada pocinho era lavado duas vezes com PBS em temperatura ambiente. O material foi fixado em fixador de Bouan por sete minutos. As células eram lavadas duas vezes com álcool 70% e duas vezes com água purificada (MiliQ, Millipore, Billerica, MA). O corante específico para cada linhagem era adicionado em seguida.

i. Osteoblastos

Para as células induzidas à diferenciação em osteoblastos foi utilizado o corante “Alizarina Red S” (Fluka Chemie, Buchs, UK) pH 4,2 e pH 7,0. Foi utilizado o corante com pH 4,2 para um poço controle e um diferenciação, e o com o pH 7,0 para o outro controle e diferenciação.

Primeiramente, os corantes Alizarina S pH 4,2 e pH 7,0 eram colocado por 15 minutos, as lamínulas eram lavadas duas vezes com água, era adicionado corante “Light Green” (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.), que foi utilizado como um contraste, e deixado em contato com as células por dois minutos. As lamínulas eram novamente lavadas duas vezes com água e passadas pela bateria para fixação.

- 1) Acetona pura (Biotec, Paraná, Brasil)
- 2) Acetona pura
- 3) Duas partes de acetona pura/uma parte de xilol puro (Biotec, Paraná, Brasil)
- 4) Uma parte de acetona pura/uma parte de xilol puro
- 5) Uma parte de acetona pura/duas partes de xilol puro
- 6) Xilol puro
- 7) Xilol puro

Após passadas pela bateria as lamínulas eram fixadas em lâminas de vidro.

ii. Adipócitos

Para coloração das células induzidas à diferenciação em adipócitos foi utilizado o corante “Oil Red O” (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.).

Após a preparação geral das lamínulas era colocado propilenoglicol (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) por dois minutos e em seguida o corante “Oil Red O” por uma hora. Após esse tempo o corante era retirado, sendo novamente colocado o propilenoglicol por um minuto, feita lavagem com água duas vezes e colocado corante hematoxilina (Biotec, Paraná, Brasil) por 30 segundo. As lamínulas eram novamente lavadas com água e colocadas em lâmina de vidro sobre uma gota de glicerol. Após o período de secagem de um dia, as lamínulas eram fixadas nas lâminas com esmalte incolor.

iii. Condrócitos

A indução para diferenciação em condrócitos foi realizada em tubo Falcon. Após o término do período de indução, os agregados celulares foram fixados com formalina a 10% por uma hora em temperatura ambiente, desidratadas em diluições seriadas de etanol e embebidos em blocos de parafina. Os cortes dos blocos (4 µm

de espessura) foram corados com solução de azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

3.3.4.2. BIOQUÍMICA

Durante o período de indução à diferenciação em osteoblastos, nas trocas de meio, o meio retirado era armazenado para determinação da atividade da fosfatase alcalina. Essa determinação era feita por método bioquímico, com utilização de kit bioquímico (“Alkaline Phosphatase Liquicolor”, Human do Brasil, Itabira, MG), realizada em aparelho bioquímico semiautomático SBA-200 (Celm, Barueri, SP). Para se certificar de que os valores obtidos estavam corretos, foi utilizado um soro controle (Serodos® plus, Human do Brasil, Itabira, MG) com valores conhecidos, com resultados dentro da faixa de variação estipulada pelo fabricante (269-448 U/L).

As dosagens foram realizadas nos meios de controle e nos meios de diferenciação.

O kit para determinação da atividade da fosfatase alcalina utiliza o método cinético otimizado, de acordo com o determinado pela Associação de Química Clínica da Alemanha (DGKC). Nesse método a velocidade de formação do p-Nitrofenol (Figura 1) é medida em absorbância por minuto em 405 nm. A intensidade da cor amarela final é proporcional à atividade da fosfatase alcalina. Os resultados são expressos em U/L.

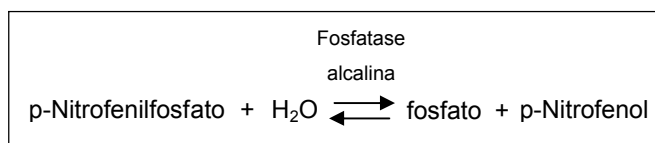


Figura 1. Reação para determinação da atividade de fosfatase alcalina.

A análise estatística foi realizada com o uso do test-T, comparando os valores médios da atividade da fosfatase alcalina encontrados para o grupo controle e para o diferenciação.

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO DAS CTMS DE CÃO

O número total de células isoladas a partir de cada amostra variou em decorrência do tamanho da amostra obtida, de sua qualidade e das quantidades de sangue e de tecido fibroso presentes na amostra (Tabela 4). O número médio de células obtidas das cinco amostras de tecido adiposo foi 146.803 células/g de tecido adiposo.

Tabela 4. Número de células isoladas por amostra de tecido adiposo subcutâneo de cães. Número total e número de células isoladas por grama de tecido adiposo.

AMOSTRA	VOLUME COLETADO	Nº TOTAL DE CÉLULAS ISOLADAS	Nº DE CÉLULAS/g
I	15 g	1.250.000	83.333
II	25 g	3.000.000	120.000
III	22 g	4.250.000	193.182
IV	20 g	4.000.000	200.000
V	20 g	2.750.000	137.500

4.2. CULTIVO

4.2.1. PASSAGEM E VIABILIDADE CELULAR

O número de células obtido por passagem e a viabilidade celular estão apresentados na Tabela 5. Para a diferenciação foram utilizadas células a partir da terceira passagem devido a homogeneidade da amostra.

Tabela 5. Número de células obtido por passagem e viabilidade das células de cultivo, isoladas do tecido adiposo subcutâneo de cães.

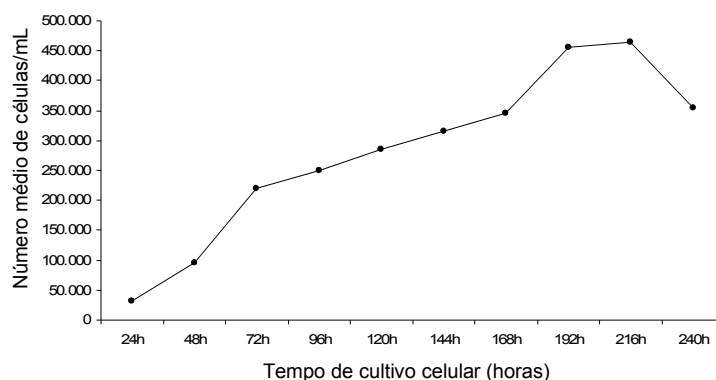
		AMOSTRA I		AMOSTRA II		AMOSTRA III		AMOSTRA IV		AMOSTRA V	
P	V%	Cél./mL	V%	Cél./mL	V%	Cél./mL	V%	Cél./mL	V%	Cél./mL	
P1	100%	0,20x10 ⁶	96%	0,34x10 ⁶	100%	4,25x10 ⁶	100%	4,3x10 ⁶	100%	1,29x10 ⁶	
P2	100%	0,28x10 ⁶	97%	0,42x10 ⁶	100%	5,05x10 ⁶	96%	2,8x10 ⁶	100%	1,75x10 ⁶	
P3	100%	0,52x10 ⁶	100%	0,65x10 ⁶	98%	5,25x10 ⁶	100%	2,26x10 ⁶	100%	2,6x10 ⁶	
P4	100%	0,65x10 ⁶	100%	0,60x10 ⁶	-	-	-	-	-	-	
P5	100%	1,65x10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	
P6	100%	0,63x10 ⁶	-	-	-	-	-	-	-	-	

V%= viabilidade celular %; Cél/mL = número de células por mL; P = passagem.

4.2.2. CURVA DE CRESCIMENTO

No estudo cinético realizado com as células de cultivo obtidas da amostra III, observou-se o padrão de crescimento das células. Os resultados da contagem diária das células permitem a análise da cinética do crescimento celular pela observação de sua curva descrita no gráfico (Figura 2).

Figura 2. Curva de crescimento das células tronco mesenquimais (amostra III) de tecido adiposo subcutâneo de cão, na terceira passagem.



Inicialmente observou-se um rápido crescimento, seguido por uma fase de crescimento regular, denominada fase exponencial, representada pela porção reta do gráfico. A saturação da densidade das células é observada quando o crescimento celular para, fase denominada platô.

Os números de células obtidas por dia estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Número médio diário de células obtidas no estudo da cinética do crescimento celular (amostra III) de tecido adiposo subcutâneo de cão, realizado com a amostra na terceira passagem.

TEMPO (h)	FRASCOS	Nº MÉDIO DE CÉLULAS/mL
24	1 e 2	32.250
48	3 e 4	95.000
72	5 e 6	220.000
96	7 e 8	250.000
120	9 e 10	285.000
144	11 e 12	315.000
168	13 e 14	345.000
192	15 e 16	455.000
216	17 e 18	465.000
240	19 e 20	355.000

4.3. DIFERENCIAÇÃO

4.3.1. AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO

4.3.1.1. CITOQUÍMICA

O corante “Oil Red O” foi utilizado para avaliação da formação de vacúolos lipídicos. Em três amostras observou-se os vacúolos corados com “Oil Red O” (Figura 3A, e B). Nas amostras em que não foi possível observar a diferenciação em adipócitos, as células morreram durante o período de indução. Não houve diferenciação nas amostras controle (Figura 3C).

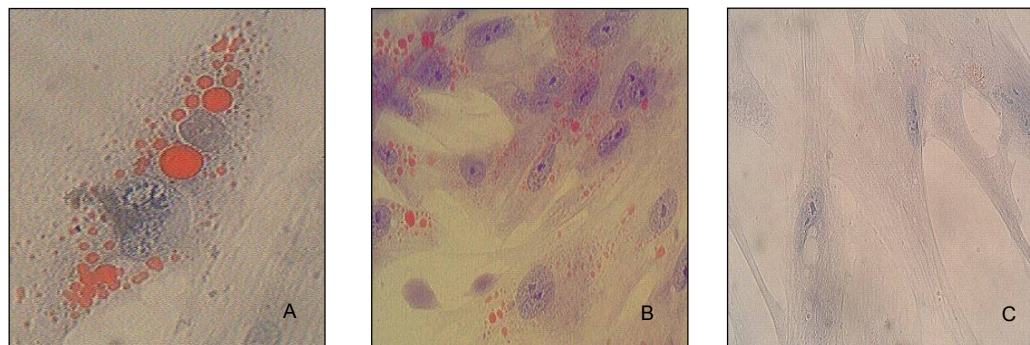


Figura 3: Diferenciação adipogênica de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de cão. Após 21 dias de indução à diferenciação adipogênica foi possível observar a presença de vacúolos lipídicos corados com o corante “Oil Red O”, com o uso do meio de diferenciação para adipócitos nº1 (A) e nº2 (B). Não foi observada diferenciação espontânea nas amostras tratadas com o meio controle (C).

As células cultivadas em meio de indução específico para osteoblastos cresceram em forma fusiforme e após o período de indução de 21 dias observaram-se depósitos de matriz extracelular. Os osteoblastos foram corados com o corante “Alizarina Red S” para detecção desses depósitos. Foi possível observar a diferenciação em três das cinco amostras induzidas à diferenciação (Figura 4A e B). Em duas amostras as células morreram durante a fase de indução. Nas amostras controle não foi observada a presença de depósitos de matriz extracelular (Figura 4C).

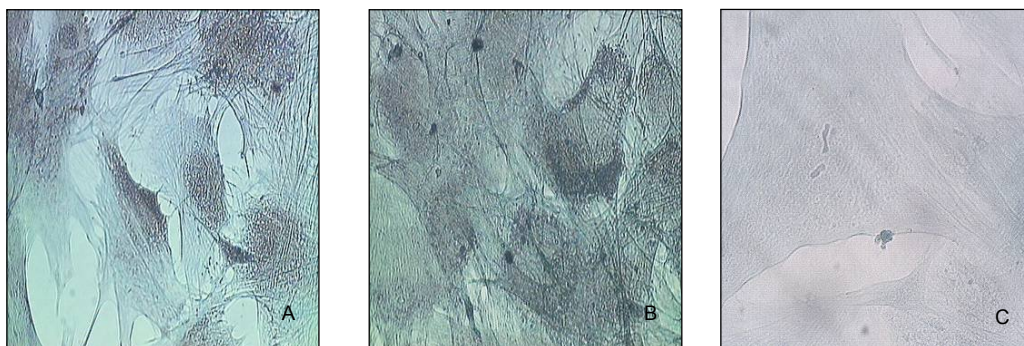


Figura 4. Diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de cão. Após 21 dias de indução à diferenciação osteogênica foi possível observar a presença de depósitos de matriz extracelular corados com o corante “Alizarina Red S”, com o uso do meio de diferenciação para osteoblastos (A e B). As amostras tratadas com o meio controle não apresentaram depósitos de matriz extracelular (C).

Os condrócitos foram corados com solução de azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para detecção dos mucopolissacarídeos da matriz intracelular. Três das cinco amostras coletadas foram induzidas à diferenciação condrocítica devido à quantidade de células necessárias para realização desse protocolo. Foi possível detectar a presença dos mucopolissacarídeos da matriz intracelular em duas das três amostras induzidas (Figura 5A e B). Não houve diferenciação nas amostras controle (Figura 5C).

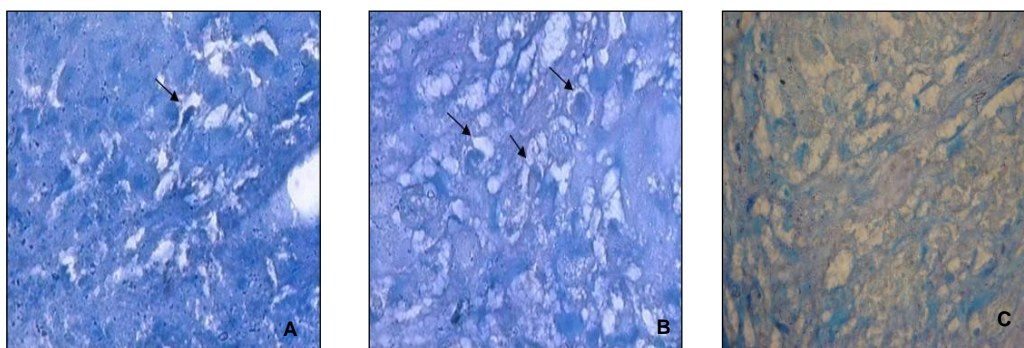
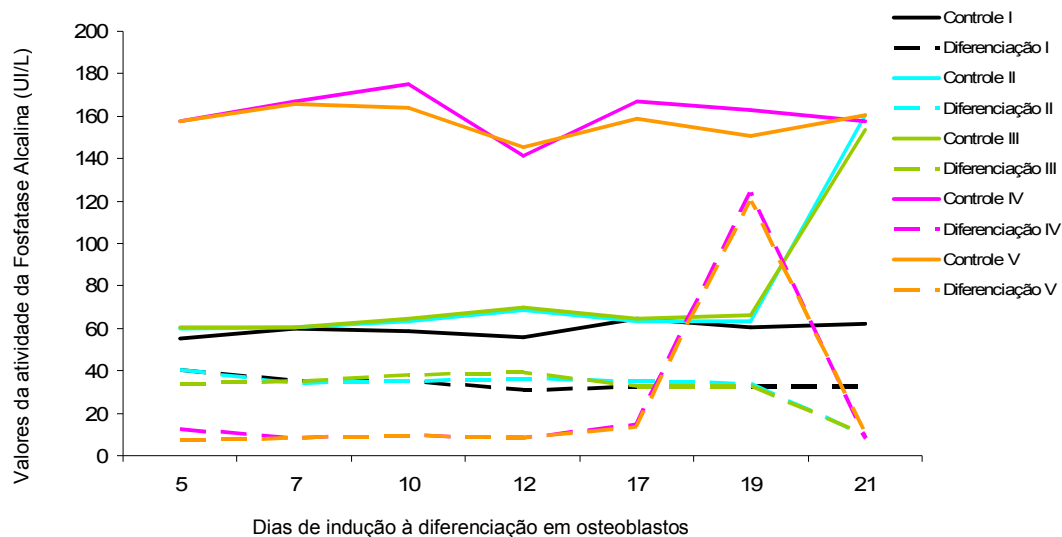


Figura 5. Diferenciação condrogênica de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de cão. Após 21 dias de indução à diferenciação condrogênica foi possível observar a presença dos mucopolissacarídeos da matriz intracelular corados com o corante Azul de Toluidina, com o uso do meio de diferenciação para condrócitos nº1 (A) e com o uso do meio de diferenciação para condrócitos nº2 (B). As amostras tratadas com o meio controle não apresentaram mucopolissacarídeos da matriz intracelular (C).

4.3.1.2. BIOQUÍMICA

A atividade da fosfatase alcalina está apresentada no gráfico (Figura 6).

Figura 6. Valores da atividade da fosfatase alcalina no período de indução à diferenciação em osteoblastos, das cinco amostras de tecido adiposo subcutâneo coletadas de cão. Amostras controle e diferenciação.



Em todas as amostras os valores da atividade da fosfatase alcalina foram mais elevados nas amostras controle do que nas amostras de diferenciação.

Na tabela 7 estão apresentados os valores individuais da atividade da fosfatase alcalina de cada amostra.

Tabela 7. Valores da atividade da fosfatase alcalina (UI/L) no período de indução à diferenciação em osteoblastos, das cinco amostras de tecido adiposo subcutâneo de cão. Amostras controle e diferenciação.

AMOSTRA	DIAS DE CULTIVO	MEIO CONTROLE	MEIO DE DIFERENCIAÇÃO
		FA (UI/L)	FA (UI/L)
I	5	55,0	40,4
	7	60,0	35,0
	10	59,0	35,0
	12	56,0	31,0
	17	64,6	32,0
	19	60,6	32,5
	21	62,0	32,3
II	5	60,0	40,4
	7	60,6	33,7
	10	63,3	35,0
	12	68,7	36,3
	17	63,3	35,0
	19	63,3	33,7
	21	160,2	9,4
III	5	60,6	33,7
	7	60,6	35,0
	10	64,6	37,7
	12	70,0	39,0
	17	64,6	32,3
	19	66,0	32,3
	21	153,5	9,4
IV	5	157,5	12,1
	7	166,9	8,1
	10	175,0	9,4
	12	141,3	8,1
	17	166,9	14,8
	19	162,9	123,8
	21	157,5	8,1
V	5	157,5	6,7
	7	165,6	8,1
	10	164,2	9,4
	12	145,4	8,1
	17	158,8	13,5
	19	150,8	119,8
	21	160,2	9,4
MÉDIA		106,5a	29,7b

FA = fosfatase alcalina.

a,b = letras diferentes na mesma linha indicam valores estatisticamente diferentes.

O valor médio da atividade da fosfatase alcalina do meio controle, nos cultivos, foi significativamente superior ao valor do meio de diferenciação.

5. DISCUSSÃO

Esse estudo demonstrou o potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica das CTMs do tecido adiposo do cão. A aderência das células isoladas à superfície plástica, sua morfologia fibroblástica e a avaliação citoquímica da diferenciação nas três linhagens demonstrou a presença das CTMs

na cultura, de acordo com o padrão ouro para identificação das CTMs estabelecido por PITTENGER *et al* (1999), que define as CTMs como fibroblastos com capacidade para se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica, quando submetidos à estímulo apropriado.

O número médio de células obtidas nos cinco isolamentos realizados nesse trabalho foi de 146.803 células/g, em uma média de 20,4g de tecido adiposo subcutâneo coletado. NEUPANE *et al* (2008) obtiveram uma média de 528.000 células/g de tecido adiposo coletado, em seu estudo realizado com isolamento das CTMs de três cães. COLLEONI *et al* (2009), em seu estudo com CTMs do tecido adiposo de 11 cavalos obteve uma média de 209.241 células/g, em uma média 14,36g de tecido adiposo coletado.

O rápido crescimento celular na fase inicial, seguido de uma fase de crescimento regular e a fase de saturação, denominada platô, observados no estudo da cinética celular, são consistentes com os resultados encontrados por COLLEONI *et al* (2009), que estudaram a cinética do crescimento das CTMs do tecido adiposo de cavalos.

As diferenciações osteogênicas e adipogênicas desse estudo, realizadas em placas de cultivo de 24 poços, utilizou a concentração de $7,5 \times 10^3$ células/cm². Outros estudos com CTMs utilizaram a concentração de 1×10^3 células/cm² para a diferenciação em adipócitos (DVORAKOVA *et al.*, 2008), e a concentração de 3×10^3 /cm² (COLLEONI *et al.*, 2009), 3×10^3 /cm² (DVORAKOVA *et al.*, 2008) e 1×10^4 /poço (IM *et al.*, 2005) para a diferenciação em osteoblastos.

O importante com relação à concentração de células plaqueadas é o tempo que a monocamada levará para atingir a confluência desejada, de 80-85%, para o início da indução à diferenciação. Nesse estudo foi observado que o plaqueamento das células nessa concentração permitia a obtenção da confluência desejada em 24h.

Para a diferenciação condrogênica, realizada em tubos tipo Falcon de 15 mL, esse estudo utilizou 200.000 células por tubo. Outros estudos com CTMs utilizaram 250.000/tubo (DVORAKOVA *et al.*, 2008), 500.000/tubo (COLLEONI *et al.*, 2009) e 1.000.000/tubo (IM *et al.*, 2005). A diferenciação condrogênica realizada nesse sistema de cultura em micromassa necessita de um número mínimo de células para que o botão formado seja visível ao final da indução e possa ser

manipulado para realização da coloração. A concentração utilizada nesse trabalho foi suficiente para esse objetivo.

Para a indução à diferenciação nas linhagens osteoblástica, adipocítica e condrocítica foi utilizado como meio base o meio de cultivo DMEM/F12 enriquecido com 15% de SFB, que apresenta bons resultados para cultura das CTMs (VIDAL *et al.*, 2007). De acordo com TAPP *et al.* (2009) o meio utilizado para a cultura tem um impacto importante no crescimento e diferenciação das CTMs originárias do tecido adiposo. A concentração de SFB utilizada também pode afetar a proliferação das CTMs. Aumentar a concentração de SFB de 10% para 15% aumenta a proliferação das CTMs, principalmente devido às citocinas e fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas, presentes no SFB (TAPP *et al.*, 2009).

A indução osteogênica das células resultou na mineralização em determinados focos em que agregados celulares estavam presentes. Esse padrão também foi observado por NEUPANE *et al.* (2008). O tempo de indução para diferenciação osteogênica foi de três semanas, período de tempo descrito em estudos com CTMs do tecido adiposo de humanos (IM *et al.*, 2005; TAPP *et al.*, 2009). Alguns autores seguem um protocolo de diferenciação de duas semanas de indução. Esse padrão foi testado com sucesso em CTMs do tecido adiposo de humanos (BUNNELL *et al.*, 2008) e em CTMs do tecido adiposo de cão (NEUPANE *et al.*, 2008), porém a composições dos meios indutores utilizada nesses estudos foi diferente da utilizada no presente estudo.

Essas variações no tempo de indução também são observadas para as outras linhagens celulares. Nesse trabalho o período de indução condrogênica foi de três semanas. O tempo da indução condrogênica varia entre duas (NEUPANE *et al.*, 2008), três (BUNNELL *et al.*, 2008) ou quatro semanas (IM *et al.*, 2005). A cultura de micromassa revelou a presença de agregados tridimensionais nos tubos controle e nos tubos de indução, que foram corados com azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As análises dos cortes histológicos realizados dessas culturas demonstraram a presença dos mucopolissacarídeos da matriz intracelular somente nos tubos induzidos.

O protocolo utilizado para diferenciação adipogênica foi eficiente na formação de vacúolos lipídicos observados pela citoquímica. NEUPANE *et al.* (2008), no estudo com CTMs do tecido adiposo de cães, utilizaram um protocolo de indução à diferenciação adipogênica semelhante ao utilizado nesse trabalho. Os autores

obtiveram resultados limitados na diferenciação em relação à quantidade de células diferenciadas, identificadas pela presença de gotículas de gordura coradas com “Oil Red O” na avaliação citoquímica.

Nas dosagens da atividade da fosfatase alcalina (FA) verificou-se que os valores foram maiores para as amostras controle do que para as amostras de diferenciação osteogênica. MARTIN *et al* (2002) realizaram a dosagem da FA na indução osteoblástica das CTMs da medula óssea de gatos, nos meios de diferenciação e controle. A atividade da FA não foi detectada em nenhum dos dois grupos. Em estudos realizados com cães (CSAKI *et al.*, 2007; CUI *et al.*, 2007; KADIYALA *et al.*, 1997^b; NEUPANE *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009; SUTER *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2007), cavalos (CARVALHO *et al.*, 2009; COLLEONI *et al.*, 2009; RICHARDSON *et al.*, 2007; VIDAL *et al.*, 2007), ratos (KADIYALA *et al.*, 1997^a; LENNON & CAPLAN, 2006) e camundongos (BITTENCOURT *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2008; TROPEL *et al.*, 2004; YAMAMOTO *et al.*, 2007) não foi avaliada a atividade da FA.

A FA é uma enzima sintetizada no fígado, osteoblastos, epitélio intestinal e renal e placenta. Em todas as espécies ocorre aumento sérico da atividade da FA quando há maior atividade osteoblástica (LASSEN, 2007).

DOMINICI *et al* (2006) propuseram três critérios para caracterizar as CTMs: aderência à superfícies plásticas, potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos e expressão de marcadores de superfície específicos. Esses marcadores são: CD (grupamento de diferenciação)105, CD73 e CD90, que devem ser positivos em mais de 95% da cultura e CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 α e CD19, que não devem ser expressos em pelo menos 95% da cultura.

Entretanto, a caracterização de marcadores de superfícies para CTMs de animais é desafiadora porque não há disponibilidade de marcadores comerciais para as diferentes espécies animais e nem todos os marcadores utilizados nas CTMs de humanos e murinos apresentam reação cruzada com as outras espécies (TAPP *et al.*, 2009). Os estudos realizados com isolamento das CTMs de animais, tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo, que utilizaram marcadores de superfície para identificação das células isoladas foram limitados quanto ao número de marcadores utilizados e possuem resultados bastante distintos entre si.

ZHANG *et al* (2007) observaram que em amostras de terceira passagem, isoladas do tecido adiposo de cães, foram positivas para os marcadores CD29 e

CD44, enquanto CSAKI *et al* (2007) no estudo com CTMs da medula óssea de cão, observou que as amostras eram positivas para os marcadores CD105 e CD90 e negativas para os marcadores CD45 e CD34. Em amostras isoladas do tecido adiposo de eqüinos, CARVALHO *et al* (2009) observaram que os marcadores de superfície CD90 e CD44 eram positivos e CD13 negativo.

Outros estudos utilizaram outras técnicas para identificação das células isoladas e avaliação da diferenciação. Em eqüinos, estudos com CTMs do tecido adiposo utilizaram a citoquímica para avaliação da diferenciação celular (VIDAL *et al.*, 2007). Em seu estudo com amostras de tecido adiposo de cães, NEUPANE *et al* (2008) isolaram CTMs e comprovaram a natureza das células com uso das técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real e citoquímica. Em outro estudo com CTMs do tecido adiposo de cães, CUI *et al* (2007) isolaram CTMs de um cão e após a indução à diferenciação nas três linhagens de tecidos, a avaliação da diferenciação foi feita pela citoquímica.

Este estudo baseou-se no padrão ouro para a identificação das CTMs, estabelecido por PITTENGER *et al* (1999), que define as CTMs com fibroblastos com capacidade para se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica, quando submetidos à estímulo apropriado. Essa definição funcional das CTMs permite a afirmação da natureza de uma população das CTMs na ausência de marcadores específicos, uma vez que não é possível estabelecer um padrão para a utilização de marcadores de superfície na medicina veterinária, ou usar como referência os resultados obtidos em estudos de outras espécies para estudos realizados com o cão.

6. CONCLUSÕES

- 6.1.** O tecido adiposo do cão é uma boa fonte das CTMs, de fácil acesso, que possibilita o isolamento das CTMs a partir de pequenas quantidades de tecido;
- 6.2.** o cultivo das CTMs isoladas do tecido adiposo de cães é possível com a utilização de meio de cultivo DMEM/F12 suplementado com 15% de SFB;
- 6.3.** a diferenciação das CTMs em adipócitos e condrócitos é possível com utilização de meio comercial e meio de cultivo DMEM/F12 suplementado com 15% de SFB adicionado de indutores;
- 6.4.** a caracterização das CTMs isoladas é possível pela indução à diferenciação das células em tecido adiposo, ósseo e cartilaginoso e pela avaliação citoquímica dessas células diferenciadas;
- 6.5.** a avaliação da atividade da fosfatase alcalina não é um bom marcador da diferenciação osteogênica das CTMs.

7. REFERÊNCIAS

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.568-584, 2004.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A.P.E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, n.14, v.1, p.22-24, 2006.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolations, expansion and differentiation. **Methods**, v.45, p.115-120, 2008.

CARVALHO, A. M.; ALVEZ, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSINI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.132, p.303-306, 2009.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, v.33, n.8, p.811-821, 2009.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.128, n.6, p.507-520, 2007.

CUI, L.; LIU, B.; LIU, G.; ZHANG, W.; CEN, L. ; SUN, J.; YIN, W.; LIU, W.; CAO, Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. **Biomaterial**, v.28, p.5477-5486, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MULLER, E.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p. 315-317, 2006.

DVORAKOVA, J.; HRUBA, A.; VELEBNY, V.; KUBALA, L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. **Cell Biology International**, v.32, p.1116-1125, 2008.

IM, G-II.; SHIN, Y-W.; LEE, K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthritis and Cartilage**, v.13, p.845-853, 2005.

KADIYALA, S.; JAISWAL, N.; BRUDER, S. P. Culture-expanded, bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate a critical-sized segmental bone defect. **Tissue engineering**, v.3, n.2, p.173-185, 1997^a.

KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell transplant**, vol.6. n.2, p.125-134, 1997^b.

KRAMPERA, M.; PIZZOLA, G.; APRILI, G.; FRANCHINI, M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v.39, p. 678-683, 2006.

LASSEN, E. D. Avaliação Laboratorial do Fígado. In: THRALL, M. A. *et al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária** – 1^a edição, São Paulo-SP: Ed. Roca, 2007, p.335-354.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, v.262, n.5, p.509-525, 2007.

LENNON, D.P.; CAPLAN, A.I. Isolation of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. **Experimental Hematology**, v.34, p.1606-1607, 2006.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental hematology**, v.30, p.879-886, 2002.

MEIRELES, L. S.; CHANGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v.119, n.11, p.2204-2213, 2006.

MINGUELL J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, n.8, p.881-887, 2000.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. **Tissue Engineering: Part A**, volume 14, n.6, p.1007-1015, 2008.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p. 143-147, 1999.

PITTINGER, M. F.; MARTIN, B. J. Mesenchymal stem cells and their potencial as cardiac therapeutics. **Circulation Research**, v.95, n.1, p.9-20, 2004.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMRY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. **Injury**, International Journal of the Care of the Injured, volume 38, suplemento 4, p.23-33, 2007.

RICHARDSON, L. E.; DUDHIA, J.; CLEGG, P. D.; SMITH, R. Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. **TRENDS in Biotechnology**, v.25, n.9, p.409-416, 2007.

SEKIYA, I.; COLTER, D. C.; PROCKOP, D. J. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.284, n.2; p.411-418, 2001.

SHUTT, B.; KHALIL, W.; KILLINGER, D. Growth and differentiation of human adipose stromal cells in culture. In: **Methods in molecular medicine: Human Cell Culture Protocols**. New Jersey, Ed.Human Press, 1996, p.41-51.

SILVEIRA, A. C. C.; LIMA, R. S.; PENHA, E. M.; MACAMBIRA, S. G.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; BARROUIN-MELO, S. M.; AGUIAR, P. H. P. Harvest and characterization of mesenchymal canine stem cells from adipose tissue and bone marrow. In: 8th International Veterinary Immunology Symposium, 2009, Ouro Preto. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.128, 2009, p.342.

SUNG, J.H.; YANG, H.-M.; PARK, J.B.; CHOI, G.-S.; JOH, J.-W, KWON, C.H.; CHUN, J.M., LEE, S.-K.; KIM, S.-J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation proceedings**, v. 40, p.2649-2654, 2008.

SUTER, S.E.; GOUTHRO, T.A.; MCSWEENEY, P.A.; NASH, R.A.; HASKINS, M.E.; FELSBURG, P.J.; HENTHORN, P.S. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34⁺ cells. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 101, p.31-47, 2004.

TAPP, H.; HANLEY, E. N.; PATT, J. C.; GRUBER, H. E. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.1-9, 2009.

TROPEL, P.; NÖEL D.; LEGRAND P.; BENABID, A.; BERGER, F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell from adult mouse bone marrow. **Experimental cell research**, v.295, p.395-406, 2004.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogênica and osteogênica capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v. 36, p.613-622, 2007.

WAGNER, J.; KEAN, T.; YOUNG, R.; DENNIS, J. E.; CAPLAN, A. I. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. **Current Opinion in Biotechnology**, v.20, p.531-536, 2009.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.-I.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of Dermatological Science**, v.48, p.43-52, 2007.

ZAMPROGNO, H. Aplicabilidade das Células tronco na ortopedia veterinária. In: Congresso Brasileiro da Anclivepa, XXVIII, 2007, Florianópolis. **Anais do XXVIII Congresso Brasileiro da Anclivepa**, 2007, p74-76.

ZHANG, Z.Q.; JIN, Y.; LI, Y.Q.; ZHANG, Y.J. Isolation, culture and multi-directional differentiation potency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v.11, n.42, 2007.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MORFOMETRIA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSE DE CÃES

MORPHOLOGICAL AND MORPHOMETRICAL CHARACTERIZATION OF CANINE ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS

RESUMO

As células tronco são células não diferenciadas de embriões, fetos ou tecidos adultos. As células tronco embrionárias e fetais são pluripotentes e as células tronco adultas são multipotentes. As células tronco mesenquimais (CTM) são células multipotentes que têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em células de diversas linhagens de tecido conjuntivo como osteoblastos, condrócitos e adipócitos. As CTMs não diferenciadas exibem morfologia fibroblástica e padrão característico de marcadores de superfície. O padrão ouro para a identificação das CTMs foi estabelecido como “fibroblastos capazes de se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica”. Essa definição funcional permite a afirmação que existe uma população das CTMs na ausência de marcadores específicos. Os objetivos desse estudo foram caracterizar a morfologia e morfometria das CTMs do tecido adiposo de cães. Amostras do tecido adiposo subcutâneo de cinco cães foram coletadas e processadas para obtenção das CTMs. As células isoladas foram cultivadas e foram realizados estudos morfológicos, morfométricos e clonogênicos. Os parâmetros morfológicos avaliados apresentaram valores médios de 87,73 µm de comprimento, 21,21 µm de largura e 16,35 µm de diâmetro do núcleo. O número médio de colônias formadas foi de 30,59 UFC-F/placa. A caracterização morfológica e morfométrica das CTMs auxilia na identificação dessas células na fase de cultivo celular.

PALAVRAS-CHAVE: Morfologia, morfometria, célula tronco mesenquimais, cães.

ABSTRACT

Stem cells are non-differentiated embryo, fetal or adult tissue cells. Differently than embryonic or fetal stem cells, which are pluripotent, the adult stem cells are multipotent. Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent cells that can renew and differentiate into a variety of tissue types, such as osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Undifferentiated MSC presents fibroblastic morphology and characteristic surface markers. The golden standard for MSC identification is known as "fibroblasts able to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes". This functional definition allows for the identification of MSC in the absence of specific markers. The objective of this study was the morphological and morphometric characterization of MSC from canine adipose tissues. Samples of subcutaneous adipose tissue from five dogs were collected and studied for obtaining MSC. The isolated cells were cultured; morphological, morphometric and clonogenic studies were conducted. The morphological parameters assessed presented the following average measurements, 87.73 μm , 21.21 μm and 16.35 μm , for length, width and nucleus diameter, respectively. The average number of UFC-F was 30.59/plate. Morphological and morphometric characterization of MSC are important for their identification during cell culture.

KEY WORDS: Morphology, morphometry, mesenchymal stem cells, dogs.

1. INTRODUÇÃO

As células tronco podem ser definidas como células não diferenciadas de embriões, fetos ou tecidos adultos, que têm como particularidade o potencial de gerar células de diversos tecidos sob o estímulo bioquímico, hormonal e mecânico adequado, *in vitro* ou *in vivo* (CSAKI *et al.*, 2007).

Diferentes das células tronco embrionárias e fetais, que são pluripotentes, as células tronco adultas são multipotentes, não especializadas e já foram identificadas em diferentes órgãos e tecidos, como sangue periférico, tecido adiposo, sistema nervoso central, músculo e medula óssea (CSAKI *et al.*, 2007). As CTMs são células multipotentes que têm alta capacidade de se renovar e diferenciar em células de diversas linhagens de tecido conjuntivo (BITTENCOURT *et al.*, 2006) como osteoblastos, condrócitos, mioblastos e adipócitos (KADIYALA *et al.*, 1997).

As CTMs não diferenciadas exibem morfologia fibroblástica e padrão característico de marcadores de superfície (MARTIN *et al.*, 2002). Esses critérios, juntamente com a habilidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, têm sido usados para definição de um protótipo de fenótipo para CTMs que seja consistente entre as diferentes espécies (MARTIN *et al.*, 2002), incluindo rato (WOODBURY *et al.*, 2000), camundongo (PHINNEY *et al.*, 1999), cão (KADIYALA *et al.*, 1997) e humano (PITTENGER *et al.*, 1999).

O padrão ouro para a identificação das CTMs foi estabelecido por PITTENGER *et al.* (1999) como “fibroblastos capazes de se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica”. Essa definição funcional permite a afirmação que existe uma população das CTMs na ausência de marcadores específicos.

A engenharia tecidual é uma área promissora para o tratamento regenerativo de diversas doenças. Uma área que apresenta grande potencial é o uso das CTMs para correção de defeitos ósseos (NEUPANE *et al.*, 2008). Com os avanços das pesquisas nessa área essa realidade tem se aproximado da Medicina Veterinária.

As características morfológicas e morfométricas das CTMs são pouco relatadas na literatura. É necessário um maior conhecimento das células para monitoramento do cultivo e do crescimento celular.

Esse trabalho tem como objetivo a caracterização da morfologia e morfometria das CTMs do tecido adiposo de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A célula tronco (CT) é caracterizada por sua habilidade de se autorrenovar, se diferenciar em diversas linhagens e originar células totalmente diferenciadas. As CT pós-natais não são pluripotentes, são multipotentes. Ou seja, essas células mantêm um amplo potencial de diferenciação, mas seu potencial de desenvolvimento é mais restrito do que o das células embrionárias (BUNNELL *et al.*, 2008).

As células tronco multipotentes estão presentes em tecidos adultos (RODRIGUEZ *et al.*, 2005). Essas células foram isoladas primeiramente da medula óssea (JIANG *et al.*, 2002) mas já foram identificadas em diversos tecidos adultos como pele (TOMA *et al.*, 2001), vasos sanguíneos (SAMPAOLESI *et al.*, 2003), periósteo, músculos, membrana sinovial e tecido adiposo (IM *et al.*, 2005).

O tecido adiposo adulto é uma fonte de células tronco mesenquimal (CTMs) com potencial multipotente de diferenciação em humanos (IM *et al.*, 2005; RODRIGUEZ *et al.*, 2005; WAGNER *et al.*, 2005; POUNTOS *et al.*, 2007; BUNNELL *et al.*, 2008) e em diversas outras espécies como cavalos (CARVALHO *et al.*, 2009; COLLEONI *et al.*, 2009), camundongos (MEIRELES *et al.*, 2006; YAMAMOTO, *et al.*, 2007) e cão (CUI *et al.*, 2007; NEUPANE *et al.*, 2008).

O padrão ouro para caracterização das CTMs foi definido por PITTINGER *et al.* (1999) como fibroblastos capazes de se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica. Porém, mais recentemente, DOMINICI *et al.* (2006) propuseram três critérios para identificação das CTMs: aderência à superfícies plásticas; potencial de diferenciação multipotente em osteoblastos, adipócitos e condroblastos e expressão de marcadores de superfícies específicos.

É importante observar que não existe, atualmente, uma distinção clara entre marcadores de superfícies das CTMs da medula óssea, do tecido adiposo e fibroblastos. Além disso, a caracterização da expressão de marcadores para CTMs de animais é desafiadora porque marcadores comerciais não estão disponíveis para as diferentes espécies, e nem todos os anticorpos de humanos e murinos apresentam reação cruzada com as outras espécies (TAPP *et al.*, 2009).

Devido a essas dificuldades encontradas na medicina veterinária, a caracterização morfológica, o estabelecimento dos parâmetros morfométricos e o

estudo da clonogenicidade das CTMs do tecido adiposo de cão auxiliam na identificação dessas células. O estudo das características morfológicas e funcionais das CTMs de indivíduos sadios permite obter dados sobre as células, como tamanho do núcleo e do citoplasma e arquitetura das células, que podem ser usados para possíveis comparações com células de doadores doentes ou para monitoramento das CTMs em cultivo e observação de possíveis alterações.

Em cultivo, as CTMs apresentam características fibroblásticas (TROPEL *et al.*, 2004; DVORAKOVA *et al.*, 2008). Após o isolamento as células são arredondadas, mas quando cultivadas se tornam mais alongadas e fusiformes (SUNG *et al.*, 2008).

A capacidade de autorrenovação e diferenciação em distintos tipos celulares pode ser avaliada por ensaios denominados ensaios clonogênicos. A clonogenicidade das CTMs é demonstrada com o ensaio que permite a quantificação de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) por células mononucleares plaqueadas (FONTES *et al.*, 2006).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos realizados nesse experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (CEUA-SCA UFPR).

3.1. ISOLAMENTO

Para realização desse trabalho foram coletadas cinco amostras de tecido adiposo de cães (Tabela 8). As amostras foram coletadas do tecido adiposo subcutâneo abdominal, no centro cirúrgico, durante a cirurgia de ovariectomia eletiva. Os cães eram hígidos, sendo quatro adultos e um jovem. Os animais eram submetidos a exames pré-operatórios laboratoriais e de imagem.

Tabela 8. Amostras de tecido adiposo subcutâneo coletadas de cães.

AMOSTRA	SEXO	IDADE	VOLUME COLETADO
I	F	3 ANOS	15 g
II	F	10 MESES	14 g
III	F	8 ANOS	22 g
IV	F	10 ANOS	20 g
V	F	8 ANOS	20 g

O protocolo utilizado para o isolamento das CTMs do tecido adiposo foi adaptado do utilizado por WAGNER *et al.* (2005). Todo o procedimento foi realizado em cabine de fluxo laminar vertical, com utilização de materiais estéreis.

As amostras de tecido adiposo coletadas foram armazenadas em frascos estéreis, com tampa e mantidas em temperatura ambiente, até o momento do processamento.

Primeiramente a amostra era colocada em placa de *petri* e lavada duas vezes com solução de tampão fosfato (PBS) estéril. Após a lavagem, a amostra era macerada com auxílio de dois bisturis e então transferida para um frasco com solução de Colagenase tipo I (Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) para digestão enzimática, realizada a 37°C por 30 minutos, com agitação constante.

Após a digestão enzimática, o sobrenadante era desprezado e o restante da amostra transferido para tubo Falcon de 50mL que era centrifugado a 2.500rpm por dez minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante era desprezado e eram adicionados 10mL de solução de PBS e feita nova centrifugação, a 1.000rpm, por dez minutos. O sobrenadante era novamente desprezado e as células ressuspensas com meio de cultivo DMEM/F12 (50% de meio Dulbecco's Modified Eagle Medium e 50% de meio F12, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) para contagem e plaqueamento das células. O plaqueamento foi realizado na concentração de um milhão de células/mL de meio.

3.2. CULTIVO

As células isoladas eram plaqueadas e mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ para crescimento e expansão até atingirem o número de células necessárias para o início da indução à diferenciação celular. O cultivo era realizado

em frascos de poliestireno de 25cm² (TPP – “Techno Plastic Products”, Trasadingen, Switzerland), com meio composto de 50% de Meio Essencial Mínimo modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco®, Invitrogen, NY, USA) e 50% de meio Mistura de Nutriente de Ham F-12 (F12, Gibco®, Invitrogen, NY, USA), com 15% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas, SP) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL; Gibco®, Invitrogen, NY, USA).

Após o início do cultivo, a primeira troca de meio era realizada com 48 ou 72h de cultivo para eliminação das células não aderidas, possibilitando a purificação das CTMs por aderência em plástico.

Durante o período de manutenção das células, o meio era trocado a cada três ou quatro dias. Os frascos de cultivo eram observados em microscópio invertido para avaliação da morfologia e do crescimento das células. Quando as células atingiam 80-85% de confluência, era feita a passagem (item 3.2.1.). Após as passagens, quando o número necessário de células para o início da indução era obtido, as células eram transferidas para as placas para a diferenciação celular.

O número necessário para o início da diferenciação foi definido com base nos protocolos previamente estabelecidos (DVORAKOVA, 2008): para as induções a osteoblastos e adipócitos, que foram realizadas em placas de cultivo, 30.000 células foram colocadas em cada poço destinado à diferenciação e controle. Dessa forma, a confluência desejada (80-85%) era obtida em 24h após a transferência das células para a placa. A indução a condrócitos foi realizada em tubos, em sistema de cultivo de micromassa, utilizando 200.00 células por tubo controle e diferenciação.

A cada passagem celular era realizada a contagem total das células e a avaliação da viabilidade (item 3.2.2).

3.2.1. PASSAGEM

A passagem das células era realizada quando a monocamada atingia 80-85% de confluência. Para o processo de passagem celular foi utilizada a tripsina 0,5% (Amresco, Solon, OH) para individualização das células, possibilitando dessa forma a transferência das células para outros frascos de cultivo e o aumento do número de células.

No procedimento era utilizado 1mL de tripsina para cada frasco de cultivo de 25 cm². A enzima era deixada em contato com as células por quatro minutos, a

37°C, depois era inativada com 1mL de soro fetal bovino. Em seguida as células eram transferidas para um tubo Falcon com 4mL de meio DMEM/F12 e centrifugadas a 1.500 rpm por dez minutos. O número total de células era contado em câmara de Neubauer e avaliava-se a viabilidade e então as células eram plaqueadas em novos frascos de cultivo, em uma concentração média de $0,93 \times 10^6$ células/mL.

3.2.2. ENSAIO CLONOGÊNICO

Para realização do ensaio clonogênico, foram transferidas 2.709 células por passagem para placas de petri estéreis, descartáveis, de plástico (TPP – “Techno Plastic Products”, Trasadingen, Switzerland), com área de crescimento de $9,03 \text{ cm}^2$.

Para cada passagem de cada amostra foram utilizadas três placas com 903 células/placa. Para cada amostra de tecido adiposo coletada foi realizado o cultivo e foram feitas três passagens (P1, P2 e P3). Para cada passagem eram confeccionadas placas em triplicata para o ensaio clonogênico.

As placas eram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO_2 por 14 dias, com meio de cultivo DMEM/F12 (50% de meio “Dulbeco’s Modified Eagle Médium” e 50% de meio F12, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$; Gibco®, Invitrogen, NY, USA). Após esse período as placas eram retiradas da incubadora, secadas a temperatura ambiente e coradas com corante violeta cristal 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.).

Após a coloração as placas eram analisadas com auxílio de uma lupa (Nikon, NY, EUA) e o número de colônias formadas era contado.

3.2.3. ESTUDO MORFOLÓGICO

Para realização do estudo da morfologia celular, a cada passagem 20.000 células eram transferidas para placas de petri estéreis, descartáveis, de plástico (TPP – “Techno Plastic Products, Trasadingen”, Switzerland), com área de crescimento de $9,03 \text{ cm}^2$, contendo em seu interior uma lamínula de vidro, redonda, com 13 mm de diâmetro (Glasstecnica, São Paulo, SP).

Para cada estudo eram utilizadas quatro placas com 5.000 células/placa. Para cada amostra de tecido adiposo coletada foram realizadas três passagens (P1,

P2 e P3) e para cada passagem eram confeccionadas quatro lâminas para o estudo da morfologia, que eram mantidas pelos períodos de 24h, 48h, 72h e 96h.

As placas eram mantidas em incubadora a 37°C com 5% de CO₂ com meio de cultivo DMEM/F12 (50% de meio “Dulbeco’s Modified Eagle Médium” e 50% de meio F12, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP) e 1% de antibiótico (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 µg/mL; Gibco®, Invitrogen, NY, USA). Após 24h uma placa era retirada para coloração da lâmina com corante de Wright (Laborclin, Pinhais, PR). As lamínulas eram removidas da placa e fixadas em lâminas de vidro para posterior análise em microscópio.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico para descrição da morfologia celular e medidas com auxílio do programa “Motic Image Plus”™ 2.0. Foram medidas 50 células de cada lâmina, de cada passagem, de cada período (24h, 48h, 72h e 96h), de cada uma das cinco amostras, totalizando 3.000 células avaliadas para os parâmetros: comprimento da célula, largura da célula e diâmetro do núcleo das células.

3.3. DIFERENCIAÇÃO

Para diferenciação foram utilizadas células entre a terceira a sexta passagens, de acordo com a passagem em que a amostra atingisse o número de células desejado para o início da indução.

As células eram utilizadas a partir da terceira passagem, pois logo após o isolamento e no início do cultivo há muita contaminação com células da linhagem hematopoiética. Assim na terceira passagem, pela purificação das CTMs por aderência em plástico, a população de células já é mais homogênea, portanto seu potencial de diferenciação já é maior (BARRY & MURPHY, 2004; POUNTOS *et al.*, 2007).

O número de células utilizado foi de 30.000 células por poço para diferenciação em osteoblastos e adipócitos, e 200.000 células por tubo para condrócitos. As amostras foram induzidas à diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. O período de indução era de 21 dias.

A indução à diferenciação em osteoblastos e adipócitos foi realizada em placas de poliestireno de 24 poços (TPP – “Techno Plastic Products”, Trasadingen,

Switzerland). Dentro de cada poço utilizado para a indução foi colocada uma lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro (Glasstecnica, São Paulo, SP), previamente esterilizada. Após o plaqueamento das células nas placas era esperada a confluência de 80-85% para dar início a indução.

Para a diferenciação em condrócitos, a indução era feita em tubos Falcon (TPP – Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) de 15 mL.

3.3.1. OSTEOLASTOS

A indução à diferenciação em osteoblastos foi feita em duplicata. Para cada amostra eram utilizados dois poços de uma placa com 24 poços e dois poços para controle.

O meio controle foi o mesmo meio utilizado para manutenção das células (DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino). O meio de diferenciação continha os seguintes indutores: dexametasona (0,1 $\mu\text{mol/L}$), β -glicerolfosfato (10 mmol/L) e ascorbato (50 $\mu\text{mol/L}$). O meio de base utilizado foi o DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino.

Os meios eram trocados três vezes por semana. A cada troca de meio, o meio retirado era armazenado para dosagem da fosfatase alcalina (item 3.3.4.2.).

3.3.2. ADIPÓCITOS

Para diferenciação em adipócitos foram testados dois meios de indução adipogênica e dois meios para controle. Cada meio foi testado em duplicata, utilizando-se dois poços da placa de 24 poços.

Para controle foram utilizados dois meios: o meio nº1, preparado no laboratório (DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino) e o meio nº2, meio comercial (MSCGM SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD). Os meios eram trocados três vezes por semana.

Para indução à diferenciação também foram utilizados dois meios diferentes. O meio nº1 continha os seguintes indutores: dexametasona (1 $\mu\text{mol/L}$), insulina (5 $\mu\text{g/mL}$) e indometacina (60 $\mu\text{mol/L}$), tendo como meio base DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino. O meio era trocado três vezes por semana.

O meio nº2 era um meio de diferenciação comercial para indução adipogênica (hMSC Adipogenic Induction SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD),

contendo como agentes indutores a indometacina (0,4 mL), IBMX (Isobutilmetilxantina – 0,2 mL), insulina (2 mL), dexametasona (1 mL) e L-glutamina (4 mL). Esse meio foi utilizado alternadamente com um meio de manutenção (hMSC Adipogenic Maintenance SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD), segundo orientações do fabricante. O meio indutor era usado por três dias e o de manutenção por dois dias.

3.3.3. CONDRÓCITOS

A indução à diferenciação em condrócitos foi realizada em sistema de cultura de micromassa, em tubos Falcon de 15 mL, segundo protocolo descrito por SEKIYA *et al* (2001). A quantidade de 200.000 células era transferida para cada tubo e o tubo era centrifugado por dez minutos a 1.500 rpm. O meio sobrenadante era retirado e substituído pelo meio indutor ou controle. O botão de células era ressuspenso nesse meio e o tubo era novamente centrifugado. A indução era realizada com as células em forma de botão. Para cada amostra foram utilizados dois meios de controle e dois meios de diferenciação. Os meios eram trocados três vezes por semana.

Para controle foram utilizados dois meios: o meio nº1, preparado no laboratório (DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino) e o meio nº2, meio comercial (MSCGM SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD).

Para indução à diferenciação também foram utilizados dois meios diferentes. O meio nº1 continha os seguintes indutores: TGF β 1 (Fator de transformação de crescimento β 1 – 10 ng/mL), insulina (0,5 μ g/mL) e ácido ascórbico (50 μ mol/L), tendo como meio base DMEM/F12 com 15% de soro fetal bovino. O meio era trocado três vezes por semana.

O meio nº2 era um meio de diferenciação comercial para indução condrogênica (hMSC Chondrogenic SingleQuots, Cambrex, Walkersville, MD), contendo como agentes indutores L-glutamina (4 mL), piruvato de sódio (2 mL), dexametasona (1 mL), prolina (2 mL), ascorbato (2 mL) e ITS (insulina, transferrina e selenito de sódio – 2 mL).

3.3.4. AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO

A avaliação da diferenciação foi realizada pela citoquímica, com coloração das células com corante específico para cada linhagem.

Para as induções realizadas nas placas de 24 poços, as lamínulas foram coradas dentro das placas. Após 21 dias de indução o meio era retirado e cada pocinho era lavado duas vezes com PBS em temperatura ambiente. O material foi fixado em fixador de Bouan por sete minutos. As células eram lavadas duas vezes com álcool 70% e duas vezes com água purificada (MiliQ, Millipore, Billerica, MA). O corante específico para cada linhagem era adicionado em seguida.

i. Osteoblastos

Para as células induzidas à diferenciação em osteoblastos foi utilizado o corante “Alizarina Red S” (Fluka Chemie, Buchs, UK) pH 4,0 e pH 7,0. Foi utilizado o corante com pH 4,0 para um poço controle e um diferenciação, e o com o pH 7,0 para o outro controle e diferenciação.

Primeiramente, os corantes Alizarina S pH 4,0 e pH 7,0 eram colocado por 15 minutos, as lamínulas eram lavadas duas vezes com água, era adicionado corante “Light Green” (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.), que foi utilizado como um contraste, e deixado em contato com as células por dois minutos. As lamínulas eram novamente lavadas duas vezes com água e passadas pela bateria para fixação.

- 8) Acetona pura
- 9) Acetona pura
- 10) Duas partes de acetona pura/uma parte de xilol puro
- 11) Uma parte de acetona pura/uma parte de xilol puro
- 12) Uma parte de acetona pura/duas partes de xilol puro
- 13) Xilol puro
- 14) Xilol puro

Após passadas pela bateria as lamínulas eram fixadas em lâminas de vidro.

ii. Adipócitos

Para coloração das células induzidas à diferenciação em adipócitos foi utilizado o corante “Oil Red O” (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA.).

Após a preparação geral das lamínulas era colocado propilenoglicol por dois minutos e em seguida o corante “Oil Red O” por uma hora. Após esse tempo o corante era retirado, sendo novamente colocado o propilenoglicol por um minuto, feita lavagem com água duas vezes e colocado corante hematoxilina por 30 segundo. As lamínulas eram novamente lavadas com água e colocadas em lâmina de vidro sobre uma gota de glicerol. Após o período de secagem de um dia, as lamínulas eram fixadas nas lâminas com esmalte incolor.

iii. Condrócitos

A indução para diferenciação em condrócitos foi realizada em tubo Falcon. Após o término do período de indução, os agregados celulares foram fixados com formaldeído 10% por uma hora em temperatura ambiente, desidratadas em diluições seriadas de etanol e embebidos em blocos de parafina. Os cortes dos blocos (4µm de espessura) foram corados com solução de azul de Toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos ensaios clonogênicos, as médias de UFC-F de cada amostra foram comparadas entre as passagens P1-P2 e P2-P3. No estudo morfológico, os valores médios dos parâmetros mensurados nas cinco amostras foram comparados entre os períodos e entre as passagens P1, P2 e P3.

Utilizou-se o teste ANOVA, considerando-se diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO DAS CTMS DE CÃO

O número total de células isoladas a partir de cada amostra variou em decorrência do tamanho da amostra obtida, de sua qualidade e das quantidades de sangue e de tecido fibroso presentes na amostra (Tabela 9). O número médio de células obtidas das cinco amostras de tecido adiposo foi 146.803 células/g de tecido adiposo.

Tabela 9. Número de células isoladas por amostra de tecido adiposo subcutâneo de cães. Número total e número de células isoladas por grama de tecido adiposo.

AMOSTRA	VOLUME COLETADO	Nº TOTAL DE CÉLULAS ISOLADAS	Nº DE CÉLULAS/g
I	15 g	1.250.000	83.333
II	25 g	3.000.000	120.000
III	22 g	4.250.000	193.182
IV	20 g	4.000.000	200.000
V	20 g	2.750.000	137.500

4.2. CULTIVO

4.2.1. PASSAGEM CELULAR

Os números de células obtidos por passagem estão apresentados na Tabela 10. Para a diferenciação foram utilizadas células a partir da terceira passagem devido ao maior potencial de diferenciação.

Tabela 10. Número de células obtido por passagem das células de cultivo, isoladas do tecido adiposo subcutâneo de cães.

	AMOSTRA I	AMOSTRA II	AMOSTRA III	AMOSTRA IV	AMOSTRA V
P	Nº Cél./mL	Nº Cél./mL	Nº Cél./mL	Nº Cél./mL	Nº Cél./mL
P1	$0,20 \times 10^6$	$0,34 \times 10^6$	$4,25 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	$1,29 \times 10^6$
P2	$0,28 \times 10^6$	$0,42 \times 10^6$	$5,05 \times 10^6$	$2,8 \times 10^6$	$1,75 \times 10^6$
P3	$0,52 \times 10^6$	$0,65 \times 10^6$	$5,25 \times 10^6$	$2,26 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$
P4	$0,65 \times 10^6$	$0,60 \times 10^6$	-	-	-
P5	$1,65 \times 10^6$	-	-	-	-
P6	$0,63 \times 10^6$	-	-	-	-

Nº cél/mL = número de células por mL; P = passagem.

4.3. ENSAIO CLONOGÊNICO

Os valores médios de UFC-F formadas por placa, em cada passagem, estão apresentados na Tabela 11. O número médio de UFC-F/placa nas três passagens foi de 30,59. Na P1 a média foi de 29,10 UFC-F/placa, em P2 foi de 31,42 UFC-F/placa e em P3 foi de 31,25 UFC-F/placa.

Tabela 11. Ensaio clonogênico – número médio de UFC-F por passagem, de cada amostra de tecido adiposo subcutâneo de cão.

Nº médio de UFC-F/placa					
P	AMOSTRA I	AMOSTRA II	AMOSTRA III	AMOSTRA IV	AMOSTRA V
P1	0,33	3,00	52,00	39,50	50,66
P2	5,00	8,66	51,30	47,66	44,50
P3	20,67	8,60	38,30	48,00	40,66

UFC-F = Unidade Formadora de Colônia Fibroblástica; P = passagem.

Foi observado aumento significativo do número médio de UFC-F apenas entre as passagens P2 e P3 para a amostra I e amostra III (Tabela 12).

Tabela 12. Número médio de UFC-F por passagem realizada, para cada amostra de células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo subcutâneo de cão. Comparação entre as passagens.

Nº MÉDIO DE UFC-F/PLACA	PASSAGENS COMPARADAS	p*
AMOSTRA I	P1 X P2	0,0618
	P2 X P3	0,0003
AMOSTRA II	P1 X P2	0,0925
	P2 X P3	0,9736
AMOSTRA III	P1 X P2	0,7970
	P2 X P3	0,0019
AMOSTRA IV	P1 X P2	0,0565
	P2 X P3	0,9499
AMOSTRA V	P1 X P2	0,2605
	P2 X P3	0,4662

(*) Teste ANOVA ($p < 0,05$).

4.4. ESTUDO DA MORFOLOGIA

Os valores médios dos parâmetros mensurados das células, no período de até 96h, com intervalos de 24h, para as três passagens (P1, P2 e P3) estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros mensurados no estudo morfológico das células isoladas do tecido adiposo subcutâneo de cães, das cinco amostras.

P	Tempo (h)	Comprimento da célula (μm)	Largura da célula (μm)	Diâmetro do núcleo (μm)
P1	24	68,01 \pm 21,44	22,13 \pm 8,59	16,25 \pm 4,42
	48	84,23 \pm 43,23	24,43 \pm 10,69	17,76 \pm 5,66
	72	73,78 \pm 23,93	21,13 \pm 8,71	16,36 \pm 4,61
	96	61,04 \pm 21,02	19,57 \pm 6,22	15,52 \pm 4,51
P2	24	74,59 \pm 28,52	26,10 \pm 10,26	17,87 \pm 5,62
	48	60,64 \pm 19,67	18,59 \pm 8,71	13,87 \pm 4,65
	72	62,57 \pm 25,63	20,39 \pm 15,62	14,45 \pm 4,82
	96	65,42 \pm 23,13	17,47 \pm 5,65	14,44 \pm 4,89
P3	24	80,85 \pm 32,21	20,40 \pm 10,04	15,91 \pm 4,54
	48	98,36 \pm 52,76	28,79 \pm 22,05	17,74 \pm 6,50
	72	87,27 \pm 57,54	18,36 \pm 5,46	16,29 \pm 4,60
	96	85,02 \pm 27,26	17,45 \pm 5,11	15,49 \pm 4,39

P=passagem; h = hora.

Os valores médios dos parâmetros mensurados das células, no período de até 96h, com intervalos de 24h, estão apresentados na Tabela 14. O comprimento médio das células durante todo o estudo, nas três passagens foi de 87,73 μm , a largura média foi de 21,21 μm e a média do diâmetro do núcleo foi de 16,35 μm .

Tabela 14. Valores médios \pm desvio padrão dos parâmetros mensurados no estudo morfológico das células isoladas do tecido adiposo subcutâneo de cães, nas três passagens.

TEMPO (h)	Comprimento da célula (μm)	Largura da célula (μm)	Diâmetro do núcleo (μm)
24h	80,85 \pm 32,21	20,40 \pm 10,04	15,91 \pm 4,54
48h	98,36 \pm 52,76	28,79 \pm 22,05	17,74 \pm 6,50
72h	87,27 \pm 27,54	18,36 \pm 5,46	16,29 \pm 4,60
96h	84,44 \pm 26,39	17,40 \pm 5,09	15,46 \pm 4,36

P=passagem; h = hora.

Foi observado um crescimento significativo no comprimento das células entre todos os períodos de cultivo. A largura das células apresentou crescimento significativo entre 48h e 72h, e entre 72h e 96h. Já o diâmetro do núcleo teve alteração significativa no tamanho somente entre os períodos de 48h e 72h (Tabela 15).

Tabela 15. Parâmetros mensurados no estudo morfológico das células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo subcutâneo de cães. Comparação entre os períodos de cultivo.

PARÂMETRO	PERÍODOS COMPARADOS	p*
COMPRIMENTO	24h X 48h	0,0073
	48h X 72h	0,0075
	72h X 96h	0,0250
LARGURA	24h X 48h	0,2240
	48h X 72h	<0,0001
	72h X 96h	0,0017
DIÂMETRO DO NÚCLEO	24h X 48h	0,5440
	48h X 72h	0,0353
	72h X 96h	0,0793

(*) Teste ANOVA ($p < 0,05$); h = hora.

As células foram coradas com corante de Wright para avaliação da morfologia e mensuração dos parâmetros. Na microscopia óptica verificou-se que as células são fusiformes, com citoplasma basofílico, núcleos esféricos, acompanhando o formato das células.

As lâminas coradas após 24h (Figura 7A) de cultivo apresentavam menor concentração de células, que aumentava gradativamente com o tempo, como pôde ser observado nas lâminas após 48h (Figura 7B), 72h (Figura 7C) e 96h (Figura 7D).

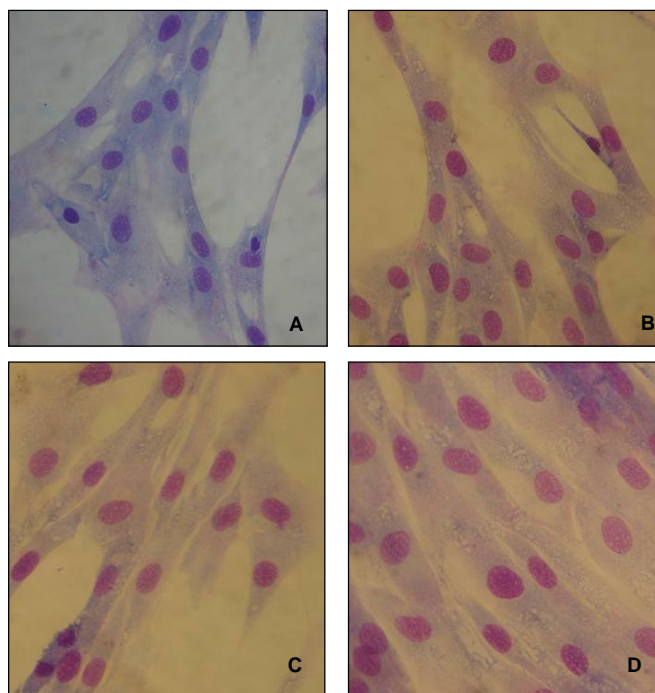


Figura 7. Estudo morfológico: células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo subcutâneo de cães (corante de Wright, X400), após cultivo de 24h (A), 48h (B), 72h (C) e 96h (D).

4.5. DIFERENCIAÇÃO

O corante “Oil Red O” foi utilizado para avaliação da formação de gotículas de gordura. Em três amostras observou-se gotículas de gordura coradas com “Oil Red O” (Figura 3A, e B). Nas amostras em que não foi possível observar a diferenciação em adipócitos, as células morreram durante o período de indução. Não houve diferenciação nas amostras controle.

As células cultivadas em meio de indução específico para osteoblastos cresceram em forma fusiforme e após o período de indução de 21 dias observaram-se depósitos de matriz extracelular. Os osteoblastos foram corados com o corante “Alizarina Red S” para detecção desses depósitos. Foi possível observar a diferenciação em três das cinco amostras induzidas à diferenciação. Em duas das amostras as células morreram durante a fase de indução. Nas amostras controle não foi observada a presença de depósitos de matriz extracelular.

Os condrócitos foram corados com solução de azul de Toluidina para detecção dos mucopolissacarídeos da matriz intracelular. Três das cinco amostras coletadas foram induzidas à diferenciação condrocítica devido à quantidade de células necessárias para realização desse protocolo. Foi possível detectar a presença dos mucopolissacarídeos da matriz intracelular em duas das três amostras induzidas. Não houve diferenciação nas amostras controle.

5. DISCUSSÃO

Esse trabalho descreve as características morfológicas, morfométricas e clonogênicas das CTMs obtidas de tecido adiposo subcutâneo de cães. A aderência das células isoladas à superfície plástica, sua morfologia fibroblástica e a avaliação citoquímica da diferenciação nas três linhagens demonstrou a presença das CTMs na cultura, sem a necessidade da utilização de técnicas de biologia molecular e citometria de fluxo, de acordo com o padrão ouro para identificação das CTMs estabelecido por PITTENGER *et al* (1999), que define as CTMs como fibroblastos com capacidade para se diferenciarem em três linhagens principais: osteoblástica, adipocítica e condrocítica, quando submetidos à estímulo apropriado.

As células em cultivo apresentaram características fibroblásticas, com formato fusiforme, citoplasma basofílico e núcleos esféricos, acompanhando o

formato das células. O comprimento médio das células durante todo o estudo, nas três passagens foi de 87,73 μm , a largura média foi de 21,21 μm e a média do diâmetro do núcleo foi de 16,35 μm . Estudos com CTMs de humanos descreveram as células em cultivo como células de morfologia fibroblástica (BARRY & MURPHY, 2004; DVORAKOVA *et al.*, 2008), assim como estudos realizados com CTMs de camundongos (SUNG *et al.*, 2008; TROPEL *et al.*, 2004) e de cães (CSAKI *et al.*, 2007). Porém, em nenhum dos estudos com avaliação da morfologia das CTMs foi realizado o estudo morfométrico dessas células.

A capacidade de autorrenovação foi avaliada por ensaios clonogênicos, que demonstraram a clonogenicidade das CTMs. O número médio de UFC-F/placa encontrado no presente estudo foi de 30,59, com o plaqueamento de células na concentração de 903 células/placa. DVORAKOVA *et al* (2008) obtiveram um valor médio de 32,3 UFC-F/milhão de células plaqueadas, em um estudo da clonogenicidade das CTMs de humanos. SUNG *et al* (2008) avaliaram o número de UFC-F das CTMs de camundongos e NEUPANE *et al* (2008) das CTMs de cães, porém não relataram os valores encontrados.

O controle do tamanho da célula é um aspecto importante do desenvolvimento celular e o controle da morfologia celular é essencial para a diferenciação celular e para o desenvolvimento de órgãos e tecidos. O tamanho da célula é dependente do tipo celular e de seu estágio no ciclo celular (KHARITONOVA & VASILIEV, 2008).

No cultivo, alterações do número, tamanho e área da célula acontecem durante o crescimento celular (VASILIEV, 2004). A forma da célula é controlada por estruturas do citoesqueleto interno e estruturas de adesão fixando a célula à superfície e às outras células (MOIZHESS & VASILIEV, 2001; ROVENSKY *et al.*, 2001).

Até o presente momento, não existem relatos de estudos da morfologia e morfometria das CTMs do tecido adiposo de cães.

6. CONCLUSÕES

- 6.1.** As CTMs isoladas de tecido adiposo de cães são fibroblásticas, fusiformes, com citoplasma basofílico, núcleos esféricos, acompanhando o formato das células;
- 6.2.** as CTMs de cães em cultivo tem comprimento médio de 87,73 μm , largura média de 21,21 μm e média do diâmetro do núcleo de 16,35 μm ;
- 6.3.** as CTMs de cães formam UFC-F em placas, com número médio de 30,59 UFC-F/placa, sendo a média de 29,10 UFC-F/placa para P1; 31,42 UFC-F/placa para P2 e 31,25 UFC-F/placa para P3;
- 6.4.** o crescimento das CTMs do tecido adiposo de cães é contínuo, com aumento significativo no comprimento das células nos períodos de cultivo.

7. REFERÊNCIAS

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.568-584, 2004.

BITTENCOURT, R.A.C.; PEREIRA, H.R.; FELISBINO, S.L.; MURADOR, P.; OLIVEIRA, A.P.E.; DEFFUNE, E. Isolamento de células tronco mesenquimais da medula óssea. **Acta Ortopédica Brasileira**, n.14, v.1, p.22-24, 2006.

BUNNELL, B.A.; FLAAT, M.; GAGLIARDI, C.; PATEL, B.; RIPOLL, C. Adipose-derived stem cells: Isolations, expansion and differentiation. **Methods**, v.45, p.115-120, 2008.

CARVALHO, A. M.; ALVEZ, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSINI, C. A.; OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.132, p.303-306, 2009.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.128, n.6, p.507-520, 2007.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, v.33, n.8, p.811-821, 2009.

CUI, L.; LIU, B.; LIU, G.; ZHANG, W.; CEN, L. ; SUN, J.; YIN, W.; LIU, W.; CAO, Y. Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. **Biomaterial**, v.28, p.5477-5486, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MULLER, E.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p. 315-317, 2006.

DVORAKOVA, J.; HRUBA, A.; VELEBNY, V.; KUBALA, L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. **Cell Biology International**, v.32, p.1116-1125, 2008.

FONTES, A. M.; ORELLANA, M. D.; PRATA, K. L. Células tronco e seus métodos de estudo. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células tronco: a nova fronteira da medicina**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2006. 264p.

IM, G-II.; SHIN, Y-W.; LEE, K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthritis and Cartilage**, v.13, p.845-853, 2005.

JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B. N.; REINHARDT, R. L.; SCHWARTZ, R. E.; KEENE, C. D.; ORTIZ-GONZALEZ, X. R.; REYES, M.; LENVIK, T.; LUND, T.; BLACKSTAD, M.; DU, J.; ALDRICH, S.; LISBERG, A.; LOW, W. C.; LARGAESPADA, D. A.; VERFAILLIE, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v.418, p.41-49, 2002.

KADIYALA, S.; YOUNG, R.G.; THIEDE, M.A.; BRUDER, S.P. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. **Cell transplant**, vol.6. n.2, p.125-134, 1997.

KHARITONOVA, M. A.; VASILEV, J. M. Controlling cell length. **Seminar in Cells & Developmental Biology**, v.19, p.480-484, 2008.

MARTIN, D.R.; COX, N.R.; HATHCOCK, T.L.; NIEMEYER, G.P.; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental hematology**, v.30, p.879-886, 2002.

MEIRELES, L. S.; CHANGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v.119, n.11, p.2204-2213, 2006.

MOIZHESS, T. G.; VASILIEV, J. M. Substrate-induced polarization of cultured epitheliocytes and fibroblasts: non-reactivity of Ras-transformed cells. **Cell Biology International**, v.25, n.9, p.931-934, 2001.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. **Tissue Engineering**: Part A, volume 14, n.6, p.1007-1015, 2008.

PHINNEY, D.G.; KOPEN, G.; ISAACSON, R.L.; PROCKOP, D.J. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth and differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.72, n.4 p.570-585, 1999.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v.284, n.5411, p. 143-147, 1999.

POUNTOS, I.; CORSCADDEN, D.; EMRY, P.; GIANNOUDIS, P. V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. **Injury**, International Journal of the Care of the Injured, volume 38, suplemento 4, p.23-33, 2007.

RODRIGUEZ, A. M.; ELABD, C.; AMRI, E. Z.; AILHAUD, G.; DANI, C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, v.87, p.125-128, 2005.

ROVENSKY, Y. U. A.; DOMNINA, L. V.; IVANOVA, O. Y. U.; VASILIEV, J. M. Responses of epithelial and fibroblast-like cells to discontinuous configuration of the culture substrate. **Membrane Cell Biology**, v.14, n.5, p.617-627, 2001.

SAMPAOLESI, M.; TORRENTE, Y.; INNOCENZI, A.; TONLORENZI, R.; D'ANTONA, G.; PELLEGRINO, M. A.; BARRESI, R.; BRESOLIN, N.; De ANGELIS, M. G.; CAMPBELL, K. P.; BOTTINELLI, R.; COSSU, G. Cell therapy of alfa-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. **Science**, v.310, p.487-492, 2003.

SUNG, J.H.; YANG, H.-M.; PARK, J.B.; CHOI, G.-S.; JOH, J.-W, KWON, C.H.; CHUN, J.M., LEE, S.-K.; KIM, S.-J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation proceedings**, v. 40, p.2649-2654, 2008.

TAPP, H.; HANLEY, E. N.; PATT, J. C.; GRUBER, H. E. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair. **Experimental Biology and Medicine**, v.234, p.1-9, 2009.

TOMA, J. G.; AKHAVA, M.; FERNANDES, K. J.; BARNABÉ-HEIDER, F.; SADIKOT, A.; KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Isolation of multipotent adult stem cells from dermis of mammalian skin. **Nature Cell Biology**, v.3, p.778-784, 2001.

TROPEL, P.; NÖEL D.; LEGRAND P.; BENABID, A.; BERGER, F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell from adult mouse bone marrow. **Experimental cell research**, v.295, p.395-406, 2004.

VASILIEV J. M. Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells. **International Journal of Developmental Biology**, v.48, n.5–6, p.425–439, 2004.

WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M.; WIRKNER, U.; KRAUSE, U.; BLAKE, J.; SCHWAGER, C.; ECKSTEIN, V.; ANSORGE, W.; HO, A.D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. **Experimental Hematology**, v.33, p.1402-1416, 2005.

WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v.61, n.4, p.364-370, 2000.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.-I.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of Dermatological Science**, v.48, p.43-52, 2007.

ANEXO 1

PREPARO DE SOLUÇÕES

1. PBS – Solução de Tampão fosfato

- Cloreto de Sódio (NaCl) – 8,77g
- Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na_2HPO_4) – 1,02g
- Fosfato de Sódio Monobásico Anidro ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) – 0,34g
- Água destilada – q.s.p. 1.000 mL

2. Fixador de Bouan

- Formol – 20mL
- Ácido Pícrico (solução saturada) – 75mL
- Ácido Acético Glacial – 5mL
- Ácido Crômico – 1,5g
- Uréia – 2g